

明 細 書

免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターを用いる腫瘍の遺伝子治療

技術分野

[0001] 本発明は、免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターを用いる腫瘍の遺伝子治療に関する。

背景技術

[0002] 近年、サイトカインを用いた癌に対する免疫療法が注目されている。例えば、外科手術、放射線治療、および化学療法を含む多様なアプローチにも関わらず治療不能と考えられている悪性脳腫瘍の1つである膠芽細胞腫 (Glioblastoma multiforme; GBM) (Shapiro, W.R., Arch. Neurol., 56: 429-432, 1999) の治療のために、遺伝子導入を用いた治療戦略が模索されている (Ram, Z. et al., Cancer Res., 53: 83-88, 1993; Sampson, J.H. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 93: 10399-10404, 1996; Herrlinger, U. et al., Cancer Gene Ther., 4:345-352, 1997; Seleh, M. et al., J. Natl. Cancer Inst., 91: 438-445, 1999; Giezeman-Smits, K.M. et al., Cancer Res., 60: 2449-2457, 2000)。In vivo動物モデルでの研究を基に、幾つかの遺伝子治療戦略が有望と見られているものの、その治療効果はほとんど全てのケースにおいて、遺伝子導入のレベルが低いことが限界になっている。遺伝子治療戦略の適用の成功にとっての主な障害は、組み換えウイルスベクターが腫瘍塊全体に広がらないこと、およびin vivoでの導入効率が低いことである (Ram, Z. et al., Nat. Med., 3: 1354-1361, 1997)。遺伝子治療を進展させるためには、安全で効率的に遺伝子を標的細胞に導入する能力を持つ新しいベクター系を開発する必要がある。

非特許文献1: Shapiro, W.R., Arch. Neurol., 56: 429-432, 1999

非特許文献2: Ram, Z. et al., Cancer Res., 53: 83-88, 1993

非特許文献3: Sampson, J.H. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 93: 10399-10404, 1996

非特許文献4: Herrlinger, U. et al., Cancer Gene Ther., 4:345-352, 1997

非特許文献5:Seleh, M. et al., J. Natl. Cancer Inst., 91: 438-445, 1999

非特許文献6:Giezeman-Smits, K.M. et al., Cancer Res., 60: 2449-2457, 2000

非特許文献7:Ram, Z. et al., Nat. Med., 3: 1354-1361, 1997

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0003] 本発明は、免疫刺激性サイトカイン(immunostimulatory cytokines)をコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターを用いる腫瘍の処置方法を提供することを課題とする。
- また本発明は、免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターを含む腫瘍の処置のための組成物およびキット、ならびにそれらの製造方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0004] マイナス鎖RNAウイルスは、マイナス鎖RNA(ネガティブ鎖RNAとも言う)をゲノムに持つエンベロープウイルスであり、高い感染性を持ち、細胞質においてウイルスが搭載する遺伝子を高発現させる能力を持つ。近年、マイナス鎖RNAウイルスのゲノム操作の進展により非ウイルス遺伝子を付加的に挿入できるようになり、遺伝子導入のアプローチのための新しいクラスのウイルスベクターの開発が可能となってきた(Bitzer, M. et al., J. Gene Med., 5: 543-553, 2003)。
- [0005] マイナス鎖RNAウイルスの複製サイクルは、感染細胞のゲノムDNAにインテグレートすることなく細胞質で行われることから、遺伝子治療の臨床適用における安全性が確保され、細胞培養で組み換え治療蛋白質を製造するためのツールとして、あるいはサイトカインまたはケモカインを用いた免疫遺伝子治療への適用のために適した分泌蛋白質を生産するために有用と考えられる。マイナス鎖RNAウイルスは、(i) 複製サイクルは細胞質で排他的に起こるためゲノムDNAにインテグレートされるリスクがない、(ii) 導入効率は標的細胞の細胞周期に依存しない、(iii) 異なるウイルスゲノムまたは野生型ウイルスと相同組み換えが起こらない、(iv) 細胞の取り込みに極めて短い接触時間しか要さない、(v) 広範囲の宿主細胞においてウイルスがコードする遺伝子を高強度でかつ調節可能に発現させることができる、などの利点がある。
- [0006] 本発明者らは、マイナス鎖RNAウイルスベクターを用いたサイトカイン遺伝子導入に

よる腫瘍の遺伝子治療戦略の治療的可能性を検証するため、免疫刺激性サイトカイン遺伝子を搭載したSeVベクターを腫瘍に導入し、抗腫瘍効果を調べた。免疫刺激性サイトカインの1つであるインターロイキン-2 (IL-2) 遺伝子を搭載するSeVを構築し、ラット脳腫瘍モデルにこのSeVベクターを脳内 (I.C.) 投与したところ、SeVによる腫瘍へのサイトカイン遺伝子導入は有意な腫瘍増殖の抑制をもたらすことが判明した。また、照射野生型9L細胞を末梢にワクチン接種した後、IL-2発現SeVベクターを定着脳腫瘍にインジェクションすると、腫瘍増殖は劇的に減少し、調べた10個体のラットのうち3個体において脳腫瘍を消滅させることが明らかとなった。免疫組織化学的解析では、腫瘍をIL-2発現SeVベクターで処理すると、CD4⁺ および CD8⁺ T細胞が脳腫瘍へ高レベルで浸潤した。このように、SeVベクターを用いた腫瘍への遺伝子導入は、有意な治療効果をもたらすことが明らかとなった。免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターの腫瘍への導入は、腫瘍に対する新たな遺伝子治療戦略となることが期待される。

[0007] すなわち本発明は、免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターを用いる腫瘍の処置方法、および免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターを含む腫瘍の処置のための組成物およびキット等に関し、より具体的には、請求項の各項に記載の発明に関する。なお本発明は、請求項の各項に記載の発明の1つまたは複数(または全部)の所望の組み合わせからなる発明、特に、同一の独立項(他の項に記載の発明に包含されない発明に関する項)を引用する項(従属項)に記載の発明の1つまたは複数(または全部)の所望の組み合わせからなる発明にも関する。各独立項に記載の発明には、その従属項の任意の組み合わせからなる発明も意図されている。すなわち本発明は、以下の発明を含む。

[1]免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターまたは該ベクターが導入された細胞を腫瘍部位に投与する工程を含む、抗腫瘍処置方法、

[2]腫瘍抗原または該抗原を発現するベクターで免疫する工程をさらに含む、[1]に記載の方法、

[3]該腫瘍抗原または該抗原を発現するベクターを皮下接種により免疫する、[2]に記載の方法、

- [4] 該腫瘍抗原が増殖能を失わせた腫瘍細胞または腫瘍細胞溶解物である、[2] または[3]に記載の方法、
- [5] 腫瘍が脳腫瘍である、[1]から[4]のいずれかに記載の方法、
- [6] 免疫刺激性サイトカインがインターロイキン-2である、[1]から[5]のいずれかに記載の方法、
- [7] 免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターまたは該ベクターが導入された細胞を有効成分として含む抗腫瘍組成物、
- [8] 免疫刺激性サイトカインがインターロイキン-2である、[7]に記載の組成物、
- [9] (a) 免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクター、および、(b) 腫瘍抗原または該抗原を発現するベクター、を含む抗腫瘍処置のためのキット、
- [10] 免疫刺激性サイトカインがインターロイキン-2である、[9]に記載のキット。

発明の効果

- [0008] 本発明により、マイナス鎖RNAウイルスベクターは免疫刺激性サイトカイン遺伝子を効率的に脳内腫瘍に導入することが実証されると共に、免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターのi.c.投与は著しい抗神経膠腫効果を発揮することができ、特に、腫瘍抗原の免疫接種と組み合わせることにより定着脳腫瘍を完全に消滅させることが実証された。これまでに、神経膠腫組織での適当量の免疫刺激性サイトカイン分泌が、定着脳腫瘍を消滅させるのに十分な細胞傷害性T細胞を動員できることが、照射した全腫瘍細胞ワクチンのs.c.投与で免疫を行った動物において報告されている (Iwadate, Y. et al., Cancer Res., 61: 8769-8774, 2001)。例えば免疫特権状態 (immunologically privileged state) であっても、IL-2のようにケモタキシス作用のある分子の局所発現によりエフェクター細胞の腫瘍組織への移動が効果的に促進される場合には、脳腫瘍は全身性免疫に感受性 (susceptible) となることができる。本発明において、マイナス鎖RNAウイルスベクターは神経膠腫組織においてIL-2蛋白質の実態的な発現をひき起こし、IL-2蛋白質の局所的濃度は、免疫担当細胞を有意に誘導し、その結果脳腫瘍の増殖を抑制させるのに必要なレベルに達した。このように、本発明の方法は、特に免疫特権状態にある脳内の腫瘍に対する効

果的な治療手段となる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]センダイウイルスベクターの模式的なゲノム構造を示す図である。lacZまたはヒトIL-2遺伝子を搭載する野生型SeV、並びにMおよびF遺伝子両欠失型SeVベクターが示されている。lacZまたはヒトIL-2遺伝子のオープンリーディングフレームを、SeV特異的転写調節シグナル配列であるendおよびstartシグナルと共に、リーダー (ld) およびNP遺伝子の間に挿入した。

[図2]lacZ-SeV/ $\Delta M \Delta F$ をin situで投与した、ラット脳組織 (上パネル) および7日間脳内で増殖させた9L脳腫瘍 (下パネル) のX-Gal染色を示す図である。ベクター投与の4、7、および14日後にX-Gal染色を行った (x200倍)。脳組織および脳腫瘍共に、beta-ガラクトシダーゼの最大発現または蓄積はベクター注入の7日後に観察され、発現レベルは14日まで持続した。

[図3]hIL2-SeV/ $\Delta M \Delta F$ のi.c.投与および照射9L細胞によるs.c.免疫の治療を行った全9L脳腫瘍のMRI像 (Gd-DTPA注入後の前頭面のT1強調像)。Gd-DTPAで強調された腫瘍は白い領域として可視化されている。組み合わせ治療により、試験した10ラット中3匹において、腫瘍細胞接種の接種後3週目には認められた定着脳腫瘍が、4週目には完全に消滅した (Rat #3, Rat #5, Rat #10)。

[図4]腫瘍細胞接種の接種後3週目におけるGd強調MRIによる9L脳腫瘍の平均体積の評価を示す図である。s.c.免疫を組み合わせたhIL2-SeV/ $\Delta M \Delta F$ のi.c.投与 ($86.5 \pm 63.8 \text{ mm}^3$, n=10) では、未処理 ($286 \pm 51.2 \text{ mm}^3$, n=10)、s.c.免疫のみ ($197 \pm 48.9 \text{ mm}^3$, n=10)、lacZ-SeV/ $\Delta M \Delta F$ のi.c.投与とs.c.免疫の組み合わせ ($233 \pm 73.2 \text{ mm}^3$, n=6) またはhIL2-SeV/ $\Delta M \Delta F$ のi.c.投与のみ ($256 \pm 53.2 \text{ mm}^3$, n=6) の場合に比べ有意に縮小した。各バーは平均 \pm S.E.を表す。

[図5]9L細胞をday 0でi.c.接種し、day 3でベクター投与および/または照射腫瘍細胞による免疫を行ったラットのKaplan-Meier生存曲線を示す図である。未処置コントロール (白円)、s.c.免疫のみの処置 (黒円)、lacZ-SeV/ $\Delta M \Delta F$ のi.c.投与とs.c.免疫 (黒三角)、hIL2-SeV/ $\Delta M \Delta F$ のi.c.投与のみ (白三角)、hIL2-SeV/ $\Delta M \Delta F$ のi.c.投与とs.c.免疫の組み合わせ (黒四角)。log-rank testによる統計解析により、hIL2-SeV/

$\Delta M \Delta F$ のi.c.投与とs.c.免疫の処置を行ったラットは、他の処置群に比べ有意に長く生存することが示された ($p < 0.05$)。

[図6]9L脳腫瘍におけるIL-2発現の免疫組織化学解析を示す図である。hIL2-SeV/ $\Delta M \Delta F$ をi.c.投与した9L脳腫瘍。A; x100倍、B; x200倍。IL-2蛋白質が拡散して発現している。

[図7]lacZ-SeV/ $\Delta M \Delta F$ のi.c.投与および照射9L細胞のs.c.免疫 (A)、hIL2-SeV/ $\Delta M \Delta F$ のi.c.投与のみ (B)、およびhIL2-SeV/ $\Delta M \Delta F$ のi.c.投与とs.c.免疫の組み合わせ (C) の処置を行ったラットのCD4、CD8、およびNK細胞抗原の発現の免疫組織化学解析を示す図である。(倍率200倍)。CD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞の浸潤は、SeV/IL-2ベクターのi.c.投与およびs.c.免疫で処置した腫瘍において、他の処置を行った腫瘍に比べより有意に観察された。

発明を実施するための最良の形態

- [0010] 本発明は、免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターまたは該ベクターが導入された細胞を腫瘍部位に投与する工程を含む、抗腫瘍処置の方法に関する。免疫刺激性サイトカイン遺伝子を搭載するマイナス鎖RNAウイルスベクターは、ベクターを導入した標的(腫瘍)に対する免疫応答を誘導し、腫瘍増殖を有意に抑制することができる。ここで抗腫瘍処置とは、腫瘍の発生および/または増殖の抑制を意味する。すなわち、腫瘍組織、または腫瘍の発生が懸念される部位、あるいは腫瘍を除去した部位などの腫瘍部位に、免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターまたは該ベクターが導入された細胞を局所投与することにより、投与部位における抗腫瘍免疫応答を誘導し、腫瘍の発生(再発を含む)または増殖(転移を含む)を抑制することができる。ベクターの導入は、in vivoまたはex vivoで行うことができ、in vivoにおいては該ベクターは直接腫瘍部位に注入され、ex vivoにおいては該ベクターは体外で細胞に導入され、その細胞が腫瘍部位に注入される。腫瘍部位とは、腫瘍そのもの、腫瘍を除去した部位、またはその近傍を言う。ここで近傍とは、ベクターが導入された細胞から分泌される免疫刺激性サイトカインが腫瘍またはその除去部位に到達する領域である。好ましくは腫瘍またはその除去部位から5 mm以内、例えば3 mm以内、2 mm以内、または1 mm以内である。ベクタ

一またはベクター導入細胞は所望の担体(例えば培養液、生理食塩水、血液、血漿、血清、体液など所望の生理的水溶液)中に溶解または懸濁し、これを腫瘍またはその近傍に直接注入することにより実施すればよい。本発明の方法により、腫瘍を効果的に治療および予防することが可能となる。

[0011] 単純な技術により高い効率で遺伝子送達が起こることは、マイナス鎖RNAウイルスベクターを介した遺伝子送達の重要な優位性の1つである。レトロウイルスベクターなどを介した遺伝子送達は一般に効率が低く、最適な遺伝子送達のためには遠心で濃縮する必要があるが、遠心操作はしばしばウイルスの力価を低下させる。また、高い効率で感染させるには毒性のある薬剤であるポリブレンを必要とする場合がある(Bunnell, B.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1995, 92: 7739-7743; Chuck, A.S., Hum. Gene Ther., 1996, 7: 743-750; Chinnasamy, D. et al., Blood 2000, 96: 1309-1316; Fehse, B. et al., Br. J. Haematol., 1998, 102: 566-574)。また、ex vivo投与においては、細胞に感染後に、遺伝子が導入された細胞を選択する工程が必要な場合がある。これに対して、マイナス鎖RNAウイルスベクターは特別な薬剤を必要とすることなく、単に細胞に接触させるだけでより優れた遺伝子送達を達成することができる。また感染効率は非常に高く、通常、ベクターの感染後に薬剤等で遺伝子導入細胞を選択する必要はない。さらに、マイナス鎖RNAウイルスベクターを介する遺伝子送達は、細胞への非常に短い暴露(30分以下)で最適効率を達成することができる。臨床場面を考えると、これらの特徴は、ex vivoおよびin vivoなどにおける投与操作を単純化し、操作に依存した細胞障害などの悪影響を最小化し得るものである。

[0012] Ex vivoによりベクターを感染を行う場合には、MOI(多重感染度; 細胞1つあたりの感染ウイルス数)は1-500の間にするのが好ましく、より好ましくは2-300、さらに好ましくは3-200、さらに好ましくは5-100、さらに好ましくは7-70である。ベクターと標的細胞との接触は短い時間でも十分であり、例えば1分以上、好ましくは3分以上、5分以上、10分以上、または20分以上接触させればよく、例えば1-60分程度、より特定すれば5分-30分程度であってよい。もちろん、それ以上の時間接触させてもよく、例えば数日間またはそれ以上接触させてもよい。細胞としては、投与する患者由来

の細胞を用いることができ、例えば患者由来の線維芽細胞の初代培養細胞を好適に用いることができる。あるいは、異種 (xenogeneic) 細胞および同種異系 (allogeneic) 細胞を用いることもできる (Iwadate, Y. et al., Cancer Res., 61: 8769-8774, 2001)。これらの xenogeneic または allogeneic な細胞は、ex vivo 注入後、宿主の免疫反応により排除されることが期待される。細胞は、ベクターを導入する前または後に、UV、X線、または gamma 線照射等により分裂能を欠損させ、その後、腫瘍に ex vivo 投与してもよい。

- [0013] ベクターに搭載する免疫刺激性サイトカインは、免疫細胞の分化および/または増殖を誘導するサイトカインであって、抗腫瘍作用を持つサイトカインを用いることができる。このようなサイトカインとしては、T細胞、NK細胞、単球、マクロファージ等から産生されるサイトカインであって、T細胞の分化および/または増殖を誘導するサイトカイン等が含まれる。免疫刺激性サイトカイン遺伝子は、例えば遺伝子配列を基に設計したプライマーを基に、T細胞由来cDNA等からPCR増幅により単離することができる。抗腫瘍効果を示すサイトカインは当業者によく知られており、それらのサイトカイン遺伝子を本発明において好適に用いることができる。本発明において特に好適に用いられる免疫刺激性サイトカインとしては、具体的には、免疫系細胞の遊走及び接着を惹起することが示されている Interleukin-2 (IL-2)、Interleukin-4 (IL-4)、Interleukin-12 (IL-12)、granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、及び Interleukin-23 (IL-23) などが含まれる。また、Fas ligand (Fas-L) も利用できる。IL-2 cDNAは、例えば Accession number NM_000586 (protein ID NP_000577)、IL-4 cDNAは、例えば Accession number M13982 (protein ID AAA59149)、および M23442 (protein ID AAA59150)、IL-12 (p35+p40) は、例えば AF180562 (protein ID AAD56385) (p35) および AF180563 (protein ID AAD56386) (p40)、GM-CSFは、例えば M11220 (protein ID AAA52578)、および A14305 (protein ID CAA01150)、IL-23 (p19+p40) は、例えば AF301620 (protein ID AAG37232) (p19) および AF180563 (p40:IL-12のp40と同一)、Fas-Lは、例えば D38122 (protein ID BAA07320) に記載されている。従って、上記に示した免疫刺激性サイトカインのアミノ酸配列をコードする所望の核酸をベクターに組み込み、本発明において用いる

ことができる。

- [0014] 上記のサイトカインは免疫系細胞の遊走及び接着を惹起することが報告されており、特に、IL-2, IL-4, GM-CSFについては、脳腫瘍動物モデルにおいてその有効性が示されている(IL-2: Iwate, Y. et al., *Cancer Res.*, 61: 8769-8774 (2001); IL-2, IL-4, GM-CSF: Sampson, J.H. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 93, 10399-10404 (1996); GM-CSF: Herrlinger, U. et al., *Cancer Gene Ther.* 4, 345-352 (1997); IL-4: Sele, M. et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 438-445, (1999); IL-4: Giezeman-Smits, K.M. et al., *Cancer Res.* 60, 2449-2457 (2000))。IL-23については、脳の自己免疫疾患において免疫系細胞の遊走に強く関与していることが示された(Becher B. et al., *J Clin Invest.* 112(8), 1186-91 (2000))。また、Fas-Lについても、chemoattractantとしての効果があることが示されている(Silvestris F et al., *Br J Haematol.* 122(1) 39-52. (2003))。腫瘍に対する IL-2 などによる免疫系賦活化については、以下の文献も参照のこと(Iwate, Y. et al. (2000) *Cancer Gene Ther.* 7, 1263-1269; Iwate, Y. et al. (2001) *Cancer Res.* 61, 8769-8774; Iwate, Y. et al. (2002) *Int. J. Mol. Med.* 10, 741-747; Iwate, Y. et al. (1997) *Oncology (Basel)* 54, 329-334; Iwate, Y. et al. (2003) *Int. J. Oncol.* 23, 483-488)。
- [0015] 本発明において用いられるサイトカイン遺伝子は、ヒト由来であっても、その他の哺乳動物由来、例えばマウス、ラット、ウサギ、ブタ、サルなどの霊長類由来であってもよい。また本発明においてサイトカインには、生物学的活性を維持している限り天然のサイトカインのバリエーションが含まれる。例えばN末端またはC末端の1〜数残基(例えば2、3、4、5、または6残基)のアミノ酸が欠失または付加されたポリペプチド、および1〜数残基(例えば2、3、4、5、または6残基)のアミノ酸が置換されたポリペプチドなどが挙げられる。サイトカインの生物学的活性は、公知のサイトカイン活性のアッセイ方法により測定することができる。あるいは、本明細書に記載の腫瘍抑制のアッセイ方法により測定することができる。天然のサイトカインと同等の生物学的活性を有するこれらのバリエーションをコードする遺伝子は、本発明に方法に従ってマイナス鎖RNAウイルスベクターを介して腫瘍に投与することにより、腫瘍増殖に対して天然のサイトカインと同等の抗腫瘍効果を示すことが期待される。天然のサイトカインのバリエーションとしては

、天然のサイトカインの断片、アナログ、派生体、および他のポリペプチドとの融合蛋白質(例えば異種シグナルペプチドを持つサイトカイン、または抗体断片を融合させたポリペプチドなど)が含まれる。具体的には、本発明において用いられ得るサイトカインには、天然のサイトカインまたは断片のアミノ酸配列の1またはそれ以上のアミノ酸を置換、欠失、および/または付加した配列を含み、天然のサイトカインと同等の生物学的活性を有するポリペプチドが含まれる。断片とは、天然のサイトカインポリペプチドの一部を含むポリペプチドであり、例えばN末端欠失体あるいはC末端欠失体が含まれる。生物学的活性を持つサイトカインの断片は、通常、天然のポリペプチド(分泌後の成熟型の形態)の70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の連続領域を含む。

[0016] アミノ酸配列のバリエーションは、例えば天然のポリペプチドをコードするDNAに変異を導入することにより調製することができる(Walker and Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel et al. (1987) Methods Enzymol. 154:367-382; Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.); U.S. Pat. No. 4,873,192)。生物学的活性に影響を与えないようにアミノ酸を置換するためのガイダンスとしては、例えばDayhoffら(Dayhoff et al. (1978) in Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.))が挙げられる。

[0017] 改変されるアミノ酸数に特に制限はないが、例えば天然の成熟型ポリペプチドの全アミノ酸の30%以内、好ましくは25%以内、より好ましくは20%以内、より好ましくは15%以内、より好ましくは10%以内であり、例えば15アミノ酸以内、好ましくは10アミノ酸以内、より好ましくは8アミノ酸以内、より好ましくは5アミノ酸以内、より好ましくは3アミノ酸以内である。アミノ酸を置換する場合は、側鎖の性質が似たアミノ酸に置換することにより蛋白質の活性を維持することが期待できる。このような置換は、本発明において保存的置換という。保存的置換は、例えば塩基性アミノ酸(例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性アミノ酸(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性ア

ミノ酸 (例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性アミノ酸 (例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 β 分岐アミノ酸 (例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族アミノ酸 (例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン) などの各グループ内のアミノ酸間の置換などが挙げられる。また、例えば、BLOSUM62置換マトリックス (S. Henikoff and J.G. Henikoff, 1992, Proc. Acad. Natl. Sci. USA 89: 10915-10919) において、正の値の関係にあるアミノ酸間の置換が挙げられる。

- [0018] また、サイトカインバリエントには、天然型ポリペプチドのアミノ酸配列と高いホモロジーを示すアミノ酸配列を含むポリペプチドが挙げられる。高いホモロジーとしては、例えば70%以上、より好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは93%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上の同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。アミノ酸配列の同一性は、例えばBLASTPプログラム (Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410) を用いて決定することができる。例えばNCBI (National Center for Biothchnology Information) のBLASTのウェブページにおいてLow complexityを含むフィルターは全てOFFにして、デフォルトのパラメータを用いて検索を行う (Altschul, S.F. et al. (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L. et al. (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) Genome Res. 7:649-656)。例えば2つの配列の比較を行うblast2sequencesプログラム (Tatiana A et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) により、2配列のアライメントを作成し、配列の同一性を決定することができる。ギャップはミスマッチと同様に扱い、例えば天然型サイトカイン (分泌後の成熟型の形態) のアミノ酸配列全体に対する同一性の値を計算する。具体的には、天然型サイトカイン (成熟型の形態) の全アミノ酸数における一致するアミノ酸数の割合を計算する。

- [0019] また、好適なバリエントとしては、天然のサイトカイン遺伝子のコード領域の一部または全部とストリンジェントな条件でハイブリダイズする核酸がコードするポリペプチドで

あって、天然型サイトカインと同等の生物活性を有するポリペプチドが挙げられる。ハイブリダイゼーションにおいては、例えば天然のサイトカイン遺伝子のコード領域の配列またはその相補配列を含む核酸、またはハイブリダイズの対象とする核酸のどちらかからプローブを調製し、それが他方の核酸にハイブリダイズするかを検出することにより同定することができる。ストリンジेंटなハイブリダイゼーションの条件は、例えば 5xSSC、7%(W/V) SDS、100 micro-g/ml 変性サケ精子DNA、5xデンハルト液(1xデンハルト溶液は0.2%ポリビニールピロリドン、0.2%牛血清アルブミン、および0.2%フィコールを含む)を含む溶液中、60℃、好ましくは65℃、より好ましくは68℃でハイブリダイゼーションを行い、その後ハイブリダイゼーションと同じ温度で2xSSC中、好ましくは1xSSC中、より好ましくは0.5xSSC中、より好ましくは0.1xSSC中で、振盪しながら2時間洗浄する条件である。

[0020] 本発明において用いられるサイトカインは、最も好ましくはインターロイキン (IL)-2である。IL-2は、IL-2レセプター (IL-2レセプター alpha、beta、およびgamma) のリガンドとして機能し、T細胞の増殖および分化を調節するサイトカインである (Kuziel, W. A. and Gree, W. C. (1991), Interleukin-2, in The Cytokine Handbook, A. Thompson (Ed.), San Diego, Calif., Academic Press, pages 83-102; Waldmann, T. A., 1993, Immunol. Today, 14:264)。IL-2は主にCD4⁺ T細胞によって産生され、自己分泌型の増殖因子として機能する。IL-2はまた、CD4⁺およびCD8⁺の両方の細胞を含む他のTリンパ球にも作用する。またIL-2は、T細胞のヘルパーおよび細胞傷害性の両方のサブセットの活性化を導く局所炎症応答を誘導する。IL-2はまた、ナチュラルキラー (NK) 細胞の増殖および活性を刺激する。IL-2を発現するように改変した腫瘍細胞は、腫瘍に対する免疫応答を刺激し、腫瘍の増殖を抑制する。ヒトIL-2 (成熟型) cDNAの塩基配列を配列番号:1に、IL-2のアミノ酸配列を配列番号:2に例示する。本発明においては、配列番号:2に記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子を好適に用いることができる。

[0021] また、生物学的に活性を持つIL-2のバリエーションは、当業者に数多く知られている。本発明において使用できるIL-2のバリエーションとしては、例えば欧州特許出願 136,489、91,539、88,195、109,748、米国特許 4,518,584、4,588,584、4,752,585、4,931,543、

5,206,344、国際特許出願 WO 99/60128、特開昭61-78799、Wang, et al. Science (1984) 224:1431-1433 等に記載されているものが含まれる。例えば、N末端のAlaを欠失するIL-2断片、4アミノ酸を欠失する断片 (特開昭60-126088)、カルボキシル末端を欠失する断片 (特開昭60-126088)、天然型の分泌後のポリペプチドの125番目のシステインがセリンまたはアラニン等の中性アミノ酸に置換されたポリペプチド (des-ala-1, ser-125 IL-2 または des-ala-1, ala-125 IL-2) (米国特許 4,518,584 および 4,588,584)、104位のメチオニンがアラニンなどの中性アミノ酸に置換されたポリペプチド (des-ala-1, ala-104) などが含まれる。また、これら以外にも、IL-2の生物活性を保持する所望のバリエーションを用いてもよい。IL-2の生物学的活性は、例えばIL-2依存性の細胞傷害性T細胞またはヘルパーT細胞の増殖刺激能を、公知の方法で試験することにより知ることができる (Gillis et al., J. Immunol. (1978) 120:2027-2032; Watson, J., J. exp. Med. (1979) 1570:1510-1519)。

[0022] 上記のサイトカインをコードするcDNAを用いて、該サイトカインを発現する組み換えマイナス鎖RNAウイルスを構築する。ここでマイナス鎖RNAウイルスとは、マイナス鎖(ウイルス蛋白質をコードするセンス鎖に対するアンチセンス鎖)のRNAをゲノムとして含むウイルスのことである。マイナス鎖RNAはネガティブ鎖RNAとも呼ばれる。本発明において用いられるマイナス鎖RNAウイルスとしては、特に一本鎖マイナス鎖RNAウイルス(非分節型(non-segmented)マイナス鎖RNAウイルスとも言う)が挙げられる。「一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルス」とは、一本鎖ネガティブ鎖[すなわちマイナス鎖]RNAをゲノムに有するウイルスを言う。このようなウイルスとしては、パラミクソウイルス(Paramyxoviridae; Paramyxovirus, Morbillivirus, Rubulavirus, および Pneumovirus属等を含む)、ラブドウイルス(Rhabdoviridae; Vesiculovirus, Lyssavirus, および Ephemerovirus属等を含む)、フィロウイルス(Filoviridae)、オルトミクソウイルス(Orthomyxoviridae; Influenza virus A, B, C, および Thogoto-like viruses 等を含む)、ブニヤウイルス(Bunyaviridae; Bunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, および Phlebovirus属等を含む)、アレナウイルス(Arenaviridae)などの科に属するウイルスが含まれる。

[0023] また、マイナス鎖RNAウイルスベクターとは、マイナス鎖RNAウイルスをベースとする

、遺伝子を細胞に導入するための担体を言う。ここで「感染力」とは、マイナス鎖RNAウイルスベクターが細胞への接着能を保持しており、接着した細胞の内部にベクターに含まれる遺伝子を導入することのできる能力のことを言う。本発明のマイナス鎖RNAウイルスベクターは、伝播能を有していてもよく、伝播能を有さない欠損型ベクターであってもよい。「伝播能を有する」とは、ウイルスベクターが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が産生されることを指す。

[0024] 組み換えウイルスとは、組み換えポリヌクレオチドを介して生成したウイルス、またはそのウイルスの増幅産物を言う。組み換えポリヌクレオチドとは、両端または片端が自然の状態と同じようには結合していないポリヌクレオチドを言う。具体的には、組み換えポリヌクレオチドは、人為的にポリヌクレオチド鎖の結合が改変(切断および/または結合)されたポリヌクレオチドである。組み換えポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド合成、ヌクレアーゼ処理、リガーゼ処理等を組み合わせて、公知の遺伝子組み換え方法により生成させることができる。組み換えウイルスは、遺伝子操作により構築されたウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチドを発現させ、ウイルスを再構築することによって生成することができる。例えば、ウイルスゲノムをコードするcDNAから、ウイルス再構成する方法が知られている(Y. Nagai, A. Kato, Microbiol. Immunol., 43, 613-624 (1999))。

[0025] 本発明において遺伝子とは遺伝物質を指し、転写単位をコードする核酸を言う。遺伝子はRNAであってもDNAであってもよい。本発明において蛋白質をコードする核酸は、該蛋白質の遺伝子と呼ぶ。また一般に、遺伝子は蛋白質をコードしていなくてもよく、例えば遺伝子はリボザイムまたはアンチセンスRNAなどの機能的RNAをコードするものであってもよい。一般に、遺伝子は天然由来または人為的に設計された配列であり得る。また、本発明において「DNA」とは、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAを含む。また蛋白質をコードするとは、ポリヌクレオチドが該蛋白質を適当な条件下で発現できるように、該蛋白質のアミノ酸配列をコードするORFをセンスまたはアンチセンスに含むことを言う。

[0026] 本発明において得に好適に用いられるマイナス鎖RNAウイルスとしては、例えばパ

ラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)ウイルスのセンダイウイルス(Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス(Mumps virus)、麻疹ウイルス(Measles virus)、RSウイルス(Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス(rinderpest virus)、ジステンパーウイルス(distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス(SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス1,2,3型、オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)のインフルエンザウイルス(Influenza virus)、ラブドウイルス科(Rhabdoviridae)の水疱性口内炎ウイルス(Vesicular stomatitis virus)、狂犬病ウイルス(Rabies virus)等が挙げられる。

[0027] 本発明において用いることができるウイルスをさらに例示すれば、例えば Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocine distemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、dolphin morbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、Nipah virus (Nipah)、human parainfluenza virus-2 (HPIV-2)、simian parainfluenza virus 5 (SV5)、human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a)、human parainfluenza virus-4b (HPIV-4b)、mumps virus (Mumps)、およびNewcastle disease virus (NDV) などが含まれる。より好ましくは、Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocine distemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、dolphin morbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、および Nipah virus (Nipah) からなる群より選択されるウイルスが挙げられる。

[0028] より好ましくは、パラミクソウイルス亜科(レスピロウイルス属、ルブラウイルス属、およびモルビリウイルス属を含む)に属するウイルスまたはその誘導体であり、より好ましくはレスピロウイルス属(genus Respirovirus)(パラミクソウイルス属(Paramyxovirus)とも言う)に属するウイルスまたはその誘導体である。誘導体には、ウイルスによる遺伝子導入能を損なわないように、ウイルス遺伝子が改変されたウイルス、および化学修飾されたウイルス等が含まれる。本発明を適用可能なレスピロウイルス属ウイルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウイルス1型(HPIV-1)、ヒトパラインフルエンザウイ

ルス3型(HPIV-3)、ウシパラインフルエンザウイルス3型(BPIV-3)、センダイウイルス(Sendai virus; マウスパラインフルエンザウイルス1型とも呼ばれる)、およびサルパラインフルエンザウイルス10型(SPIV-10)などが含まれる。本発明においてパラミクソウイルスは、最も好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などに由来してもよい。

[0029] マイナス鎖RNAウイルスベクターはウイルスゲノムRNAに搭載遺伝子をアンチセンスにコードしている。ウイルスゲノムRNAとは、マイナス鎖RNAウイルスのウイルス蛋白質と共にリボヌクレオプロテイン(RNP)を形成し、該蛋白質によりゲノム中の遺伝子が発現し、このRNAが複製されて娘RNPが形成される機能を持つRNAである。一般にマイナス鎖RNAウイルスのゲノムは、3'リーダー領域と5'トレイラー領域の間に、ウイルス遺伝子がアンチセンス配列として並んだ構成をしている。各遺伝子のORFの間には、転写終結配列(E配列) - 介在配列(I配列) - 転写開始配列(S配列)が存在し、これにより各遺伝子のORFをコードするRNAが別々のシストロンとして転写される。本発明のウイルスに含まれるゲノムRNAは、該RNAにコードされる遺伝子群の発現およびRNA自身の自律的な複製に必要なウイルス蛋白質であるN(ヌクレオキャプシド)、P(ホスホ)、およびL(ラージ)をアンチセンスにコードしている。また該ゲノムRNAは、ウイルス粒子の形成に必要なM(マトリックス)蛋白質をコードしていても、していなくてもよい。さらに該RNAは、ウイルス粒子の感染に必要なエンベロップ蛋白質をコードしていても、していなくてもよい。マイナス鎖RNAウイルスのエンベロップ蛋白質としては、細胞膜融合を起こす蛋白質であるF(フュージョン)蛋白質および細胞への接着に必要なHN(ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ)蛋白質が挙げられる。但し、ある種の細胞では感染にHN蛋白質は必要なく(Markwell, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(4):978-982 (1985))、F蛋白質のみで感染が成立する。また、F蛋白質および/またはHN蛋白質以外のウイルスエンベロップ蛋白質をコードさせてもよい。このように、ゲノムRNAは天然のウイルスゲノムから適宜改変されているものであってよい(WO00/70055, WO00/70070)。

[0030] 本発明のマイナス鎖RNAウイルスは、例えばマイナス鎖RNAウイルスのゲノムRNAとウイルス蛋白質からなる複合体、すなわちリボヌクレオプロテイン(RNP)であってよい

。RNPは、例えば所望のトランスフェクション試薬と組み合わせて細胞に導入することができる。このようなRNPは、具体的には例えばマイナス鎖RNAウイルスのゲノムRNA、N蛋白質、P蛋白質、およびL蛋白質を含む複合体である。RNPは細胞内に導入されると、ウイルス蛋白質の働きによりゲノムRNAからウイルス蛋白質をコードするシストロンが転写されると共に、ゲノム自身が複製され娘RNPが形成される。ゲノムRNAの複製は、該RNAのコピー数の増加をRT-PCRまたはノーザンハイブリダイゼーション等により検出することにより確認することができる。

[0031] また本発明のマイナス鎖RNAウイルスは、好ましくはマイナス鎖RNAウイルスの感染性ウイルス粒子である。ウイルス粒子とは、ウイルス蛋白質の働きにより細胞から放出される、核酸を含む微小粒子を言う。感染性とは、マイナス鎖RNAウイルスが細胞への接着能および膜融合能を保持していることにより、接着した細胞の内部にウイルス内部の核酸を導入することのできる能力を言う。マイナス鎖RNAウイルスのウイルス粒子は、ゲノムRNAとウイルス蛋白質を含む上記RNPが細胞膜由来の脂質膜(エンベロップという)に含まれた構造をしている。本発明のマイナス鎖RNAウイルスは、伝播能を有していてもよく、あるいは伝播能を有さない欠損型ウイルスであってもよい。「伝播能を有する」とは、ウイルスが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が産生されることを指す。

[0032] 例えばパラミクソウイルス亜科に属する各ウイルスにおける各遺伝子は、一般に次のように表記される。一般に、NP遺伝子は“N”とも表記される。

レスピロウイルス属 NP P/C/V M F HN - L

ルブラウイルス属 NP P/V M F HN (SH) L

モービリウイルス属 NP P/C/V M F H - L

[0033] 例えばセンダイウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセッション番号は、NP遺伝子については M29343、M30202、M30203、M30204、M51331、M55565、M69046、X17218、P遺伝子については M30202、M30203、M30204、M55565、M69046、X00583、X17007、X17008、M遺伝子については D11446、K02742、M30202、M30203、M30204、M69046、U31956、X00584、X53056、F遺伝子については D00152、D11446、D17334、D17335、M30202、M30203、M30204、

M69046, X00152, X02131、HN遺伝子については D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, X56131、L遺伝子については D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, X58886を参照のこと。またその他のウイルスがコードするウイルス遺伝子を例示すれば、N遺伝子については、CDV, AF014953; DMV, X75961; HPIV-1, D01070; HPIV-2, M55320; HPIV-3, D10025; Mapuera, X85128; Mumps, D86172; MV, K01711; NDV, AF064091; PDPR, X74443; PDV, X75717; RPV, X68311; SeV, X00087; SV5, M81442; および Tupaia, AF079780、P遺伝子については、CDV, X51869; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, X04721; HPIV-4a, M55975; HPIV-4b, M55976; Mumps, D86173; MV, M89920; NDV, M20302; PDV, X75960; RPV, X68311; SeV, M30202; SV5, AF052755; および Tupaia, AF079780、C遺伝子については CDV, AF014953; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, D00047; MV, AB016162; RPV, X68311; SeV, AB005796; および Tupaia, AF079780、M遺伝子については CDV, M12669; DMV Z30087; HPIV-1, S38067; HPIV-2, M62734; HPIV-3, D00130; HPIV-4a, D10241; HPIV-4b, D10242; Mumps, D86171; MV, AB012948; NDV, AF089819; PDPR, Z47977; PDV, X75717; RPV, M34018; SeV, U31956; および SV5, M32248、F遺伝子については CDV, M21849; DMV, AJ224704; HPN-1, M22347; HPIV-2, M60182; HPIV-3, X05303, HPIV-4a, D49821; HPIV-4b, D49822; Mumps, D86169; MV, AB003178; NDV, AF048763; PDPR, Z37017; PDV, AJ224706; RPV, M21514; SeV, D17334; および SV5, AB021962、HN(HまたはG)遺伝子については CDV, AF112189; DMV, AJ224705; HPIV-1, U709498; HPIV-2, D000865; HPIV-3, AB012132; HPIV-4A, M34033; HPIV-4B, AB006954; Mumps, X99040; MV, K01711; NDV, AF204872; PDPR, Z81358; PDV, Z36979; RPV, AF132934; SeV, U06433; および SV-5, S76876 が例示できる。但し、各ウイルスは複数の株が知られており、株の違いにより上記に例示した以外の配列からなる遺伝子も存在する。

- [0034] これらのウイルス蛋白質をコードするORFおよび外来遺伝子のORFは、ゲノムRNAにおいて上記のE-I-S配列を介してアンチセンスに配置される。ゲノムRNAにおいて最も3'に近いORFは、3'リーダー領域と該ORFとの間にS配列のみが必要であり、Eお

よびI配列は必要ない。またゲノムRNAにおいて最も5'に近いORFは、5'トレイラー領域と該ORFとの間にE配列のみが必要であり、IおよびS配列は必要ない。また2つのORFは、例えばIRES等の配列を用いて同一シストロンとして転写させることも可能である。このような場合は、これら2つのORFの間にはE-I-S配列は必要ない。例えば、野生型のパラミクソウイルスの場合、典型的なRNAゲノムは、3'リーダー領域に続き、N、P、M、F、HN、およびL蛋白質をアンチセンスにコードする6つのORFが順に並んでおり、それに続いて5'トレイラー領域を他端に有する。本発明のゲノムRNAにおいては、ウイルス遺伝子の配置はこれに限定されるものではないが、好ましくは、野生型ウイルスと同様に、3'リーダー領域に続き、N、P、M、F、HN、およびL蛋白質をコードするORFが順に並び、それに続いて5'トレイラー領域が配置されることが好ましい。ある種のウイルスにおいては、ウイルス遺伝子が異なっているが、そのような場合でも上記と同様に各ウイルス遺伝子を野生型と同様の配置とすることが好ましい。一般にN、P、およびL遺伝子を保持しているベクターは、細胞内で自律的にRNAゲノムから遺伝子が発現し、ゲノムRNAが複製される。さらにFおよびHN遺伝子等のエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子、およびM遺伝子の働きにより、感染性のウイルス粒子が形成され、細胞外に放出される。従って、このようなベクターは伝播能を有するウイルスベクターとなる。ベクターに搭載させるサイトカイン遺伝子は、後述するように、このゲノム中の蛋白質非コード領域に挿入すればよい。

- [0035] また、本発明のマイナス鎖RNAウイルスは、野生型ウイルスが持つ遺伝子のいずれかを欠損したものであってよい。例えば、M、F、またはHN遺伝子、あるいはそれらの組み合わせが不活化または欠失したウイルスベクターも、本発明において好適に用いることができる。このようなウイルスの再構成は、例えば、欠損している遺伝子産物を外来的に供給することにより行うことができる。このようにして製造されたウイルスは、野生型ウイルスと同様に宿主細胞に接着して細胞融合を起こすが、細胞に導入されたウイルスゲノムはウイルス遺伝子に欠損を有するため、最初と同じような感染力を持つ娘ウイルス粒子は形成されない。このため、一回限りの遺伝子導入力を持つ安全なウイルスベクターとして有用である。ゲノムから欠損させる遺伝子としては、例えばF遺伝子、HN遺伝子、M遺伝子、またはその任意の組み合わせが挙げられる。例

例えば、F遺伝子が欠損した組み換えマイナス鎖RNAウイルスゲノムを発現するプラスミドを、F蛋白質の発現ベクターならびにNP、P、およびL蛋白質の発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、組み換えウイルスの再構成を行うことができる(WO00/70055, WO00/70070, WO03/025570; Li, H.-O. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000))。また、例えば、F遺伝子が染色体に組み込まれた宿主細胞を用いてウイルスを製造することもできる。ウイルス生産細胞で発現させるこれらの蛋白質群は、そのアミノ酸配列はウイルス由来の配列そのままでもなくとも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

- [0036] また、本発明において用いられるウイルスベクターとして、ウイルスゲノムが由来するウイルスのエンベロープ蛋白質とは異なる蛋白質をエンベロープに含む組み換えウイルスを作製することもできる。例えば、ウイルス再構成の際に、ベースとなるウイルスのゲノムが元来コードするエンベロープ蛋白質以外のエンベロープ蛋白質を細胞で発現させることにより、所望のエンベロープ蛋白質を有する組み換えウイルスを製造することができる。このような蛋白質に特に制限はない。細胞への感染能を与える所望の蛋白質が用いられる。例えば、他のウイルスのエンベロープ蛋白質、例えば水疱性口内炎ウイルス(Vesicular stomatitis virus; VSV)のG蛋白質(VSV-G)を挙げることができる。VSV-G蛋白質は、任意のVSV株に由来するものであつてよい。例えばIndiana血清型株(J. Virology 39: 519-528 (1981))由来のVSV-G蛋白質を用いることができるが、これに限定されない。また本発明のベクターは、他のウイルス由来のエンベロープ蛋白質を任意に組み合わせて含むことができる。例えば、このような蛋白質として、ヒト細胞に感染するウイルスに由来するエンベロープ蛋白質が好適である。このような蛋白質としては、特に制限はないが、レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ蛋白質などが挙げられる。レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ蛋白質としては、例えばマウス白血病ウイルス(MuLV) 4070A株由来のエンベロープ蛋白質を用い得る。また、MuMLV 10A1由来のエンベロープ蛋白質を用いることもできる(例えばpCL-10A1(Imgenex)(Naviaux, R. K. et al., J. Virol. 70: 5701-5705 (1996))。また、ヘルペスウイルス科の蛋白質としては、例えば単純ヘルペスウイルスのgB、

gD、gH、gp85蛋白質、EBウイルスのgp350、gp220蛋白質などが挙げられる。ヘパドナウイルス科の蛋白質としては、B型肝炎ウイルスのS蛋白質などが挙げられる。これらの蛋白質は、細胞外ドメインをF蛋白質またはHN蛋白質の細胞内ドメインと結合させた融合蛋白質として用いてもよい。このように本発明において用いられるウイルスベクターには、VSV-G蛋白質などのように、ゲノムが由来するウイルス以外のウイルスに由来するエンベロープ蛋白質を含むシュードタイプウイルスベクターが含まれる。ウイルスのゲノムRNAにはこれらのエンベロープ蛋白質をゲノムにコードされないように設計すれば、ウイルス粒子が細胞に感染した後は、ウイルスベクターからこの蛋白質が発現されることはない。

[0037] また、本発明において用いられるウイルスベクターは、例えば、エンベロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等の蛋白質、抗体またはその断片、あるいはこれらの蛋白質を細胞外領域に有し、ウイルスエンベロープ由来のポリペプチドを細胞内領域に有するキメラ蛋白質などを含むものであってもよい。これにより、ウイルスベクターの感染の特異性を制御し得る。これらはウイルスゲノムにコードされていてもよいし、ウイルスの再構成時に、ウイルスゲノム以外の遺伝子(例えば別の発現ベクターまたは宿主染色体上などにある遺伝子)の発現により供給されてもよい。

[0038] またウイルスベクターは、例えばウイルス蛋白質による免疫原性を低下させるために、またはRNAの転写効率または複製効率を高めるために、ウイルスに含まれる任意のウイルス遺伝子が野生型遺伝子から改変されていてよい。具体的には、例えば複製因子であるN、P、およびL遺伝子の中の少なくとも一つを改変し、転写または複製の機能を高めることが考えられる。また、エンベロープ蛋白質の1つであるHN蛋白質は、赤血球凝集素であるヘマグルチニン(hemagglutinin)活性とノイラミニダーゼ(neuraminidase)活性との両者の活性を有するが、例えば前者の活性を弱めることができれば、血液中でのウイルスの安定性を向上させることが可能であろうし、例えば後者の活性を改変することにより、感染能を調節することも可能である。また、F蛋白質を改変することにより膜融合能を調節することもできる。また、例えば、細胞表面の抗原分子となりうるF蛋白質および/またはHN蛋白質の抗原提示エピトープ等を解析

し、これを利用してこれらの蛋白質に関する抗原提示能を弱めた組み換えウイルスベクターを作製することもできる。

[0039] またマイナス鎖RNAウイルスベクターは、アクセサリ遺伝子が欠損したものであってよい。例えばSeVのアクセサリ遺伝子の1つであるV遺伝子をノックアウトすることにより、培養細胞における遺伝子発現および複製は障害されることなく、マウス等の宿主に対するSeVの病原性が顕著に減少する(Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71:7266-7272; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16:578-587; Curran, J. et al., WO01/04272, EP1067179)。このような弱毒化ベクターは、in vivo またはex vivoにおける低毒性の遺伝子導入用ウイルスベクターとして特に有用である。

[0040] マイナス鎖RNAウイルスは遺伝子導入ベクターとして優れており、宿主細胞の細胞質でのみ転写・複製を行い、DNAフェーズを持たないため染色体への組み込み(integration)は起こらない(Lamb, R.A. and Kolakofsky, D., Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (eds). Fields of virology. Vol. 2. Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia, 1996, pp. 1177-1204)。このため染色体異常による癌化および不死化などの安全面における問題が生じない。マイナス鎖RNAウイルスのこの特徴は、ベクター化した時の安全性に大きく寄与している。異種遺伝子発現の結果では、例えばセンダイウイルス(SeV)を連続多代継代しても殆ど塩基の変異が認められず、ゲノムの安定性が高く、挿入異種遺伝子を長期間に渡って安定に発現する事が示されている(Yu, D. et al., Genes Cells 2, 457-466 (1997))。また、カプシド構造蛋白質を持たないことによる導入遺伝子のサイズまたはパッケージングの柔軟性(flexibility)など性質上のメリットがある。このように、マイナス鎖RNAウイルスベクターは、ヒトの抗腫瘍遺伝子治療のための高効率ベクターの新しいクラスとなることが示唆される。伝播能を有するSeVベクターは、外来遺伝子を少なくとも4kbまで導入可能であり、転写ユニットを付加することによって2種類以上の遺伝子を同時に発現する事も可能である。

[0041] またセンダイウイルスは、齧歯類にとっては病原性で肺炎を生じることが知られているが、人に対しては病原性がない。これはまた、野生型センダイウイルスの経鼻的投与によって非ヒト霊長類において重篤な有害作用を示さないというこれまでの報告に

よっても支持されている (Hurwitz, J.L. et al., Vaccine 15: 533-540, 1997; Bitzer, M. et al., J. Gene Med., 5: 543-553, 2003)。センダイウイルスのこれらの特徴は、センダイウイルスベクターが、ヒトの治療へ応用できることを示唆し、センダイウイルスベクターが、ヒト癌を対象とした遺伝子治療の有望な選択肢の一つとなることを結論づけるものである。

[0042] ウイルスベクターは、ゲノムRNA中にサイトカイン遺伝子をコードする。サイトカイン遺伝子を含む組換えウイルスベクターは、上記のウイルスベクターのゲノムにサイトカイン遺伝子を挿入することによって得られる。サイトカイン遺伝子の挿入位置は、例えばウイルスゲノムの蛋白質非コード領域の所望の部位を選択することができ、例えばゲノムRNAの3'リーダー領域と3'端に最も近いウイルス蛋白質ORFとの間、各ウイルス蛋白質ORFの間、および/または5'端に最も近いウイルス蛋白質ORFと5'トレイラー領域の間に挿入することができる。また、FまたはHN遺伝子などを欠失するゲノムでは、その欠失領域にサイトカイン遺伝子をコードする核酸を挿入することができる。パラミクソウイルスに外来遺伝子を導入する場合は、ゲノムへの挿入断片のポリヌクレオチドの鎖長が6の倍数となるように挿入することが望ましい (Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 4822-4830, 1993)。挿入したサイトカイン遺伝子とウイルスORFの間には、E-I-S配列が構成されるようにする。E-I-S配列を介して2またはそれ以上の外来遺伝子をタンデムに並べて挿入することができる。

[0043] ベクターに搭載する外来遺伝子の発現レベルは、その遺伝子上流(マイナス鎖(ネガティブ鎖)の3'側)に付加する転写開始配列の種類により調節することができる (WO01/18223)。また、ゲノム上の外来遺伝子の挿入位置によって制御することができ、マイナス鎖の3'の近くに挿入するほど発現レベルが高く、5'の近くに挿入するほど発現レベルが低くなる。このように、外来遺伝子の挿入位置は、該遺伝子の所望の発現量を得るために、また前後のウイルス蛋白質をコードする遺伝子との組み合わせが最適となる様に適宜調節することができる。一般に、外来遺伝子の高い発現が得られることが有利と考えられるため、外来遺伝子は、効率の高い転写開始配列に連結し、マイナス鎖ゲノムの3'端近くに挿入することが好ましい。具体的には、3'リーダー領域と3'に最も近いウイルス蛋白質ORFとの間に挿入される。あるいは、3'に一番近いウイ

ルス蛋白質遺伝子と2番目のウイルス蛋白質遺伝子のORFの間、または3'から2番目と3番目のウイルス蛋白質遺伝子の間に挿入してもよい。野生型パラミクソウイルスにおいては、ゲノムの3'に最も近いウイルス蛋白質遺伝子はN遺伝子であり、2番目の遺伝子はP遺伝子、3番目の遺伝子はM遺伝子である。逆に、導入遺伝子の高発現が望ましくない場合は、例えば外来遺伝子の挿入位置をマイナス鎖ゲノムのなるべく5'側に設定したり、転写開始配列を効率の低いものにするなどして、ウイルスベクターからの発現レベルを低く抑えることで適切な効果が得られるようにすることも可能である。

[0044] 外来遺伝子をコードする核酸をゲノムに挿入するときに付加するS配列としては、例えばマイナス鎖RNAウイルスの所望のS配列を用いることができるが、センダイウイルスであれば、3'-UCCCWVUUWC-5' (W= AまたはC; V= A, C, またはG) (配列番号:3)の配列を好適に用いることができる。特に 3'-UCCCAGUUUC-5' (配列番号:4)、3'-UCCCACUUAC-5' (配列番号:5)、および 3'-UCCCACUUUC-5' (配列番号:6)が好ましい。これらの配列は、プラス鎖をコードするDNA配列で表すとそれぞれ 5'-AGGGTCAAAG-3' (配列番号:7)、5'-AGGGTGAATG-3' (配列番号:8)、および 5'-AGGGTGAAAG-3' (配列番号:9)である。センダイウイルスベクターのE配列としては、例えば 3'-AUUCUUUUU-5' (配列番号:10) (プラス鎖をコードするDNAでは 5'-TAAGAAAAA-3' (配列番号:11))が好ましい。I配列は、例えば任意の3塩基であってよく、具体的には 3'-GAA-5' (プラス鎖DNAでは 5'-CTT-3')を用いればよい。

[0045] マイナス鎖ウイルスベクターを製造するには、哺乳動物細胞において、マイナス鎖RNAウイルスのゲノムRNAを含むRNPの再構成に必要なウイルス蛋白質、すなわちN、P、およびL蛋白質の存在下、マイナス鎖RNAウイルスのゲノムRNAをコードするcDNAを転写させる。転写によりマイナス鎖ゲノム(すなわちウイルスゲノムと同じアンチセンス鎖)を生成させてもよく、あるいはプラス鎖(アンチゲノム。ゲノムRNAの相補鎖。)を生成させても、ウイルスRNPを再構成することができる。ベクターの再構成効率を高めるには、好ましくはプラス鎖を生成させる。RNA末端は、天然のウイルスゲノムと同様に3'リーダー配列と5'トレイラー配列の末端をなるべく正確に反映させること

が好ましい。転写産物の5'端を正確に制御するためには、例えば転写開始部位としてT7 RNAポリメラーゼ認識配列を利用し、該RNAポリメラーゼを細胞内で発現させればよい。転写産物の3'端を制御するには、例えば転写産物の3'端に自己切断型リボザイムをコードさせておき、このリボザイムにより正確に3'端が切り出されるようにすることができる(Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466)。リボザイムとしては、デルタ肝炎ウイルスのアンチゲノム鎖(antigenomic strand)由来の自己開裂リボザイムが使用できる。

[0046] 例えば組み換えセンダイウイルスは、Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466の記載等に準じて、次のようにして構築することができる。

まず、目的の外来遺伝子のcDNA塩基配列を含むDNA試料を用意する。DNA試料は、25ng/micro-l以上の濃度で電気泳動的に単一のプラスミドと確認できることが好ましい。以下、NotI部位を利用してウイルスゲノムRNAをコードするDNAに外来遺伝子を挿入する場合を例にとりて説明する。目的とするcDNA塩基配列の中にNotI認識部位が含まれる場合は、部位特異的変異導入法などを用いて、コードするアミノ酸配列を変化させないように塩基配列を改変し、NotI部位を予め除去しておくことが好ましい。この試料から目的の遺伝子断片をPCRにより増幅し回収する。2つのプライマーの5'部分にNotI部位を付加しておくことにより、増幅された断片の両端をNotI部位とする。ウイルスゲノム上に挿入された後の外来遺伝子のORFとその両側のウイルス遺伝子のORFとの間にE-I-S配列が配置されるように、プライマー中にE-I-S配列を含めるようにする。合成DNAの長さは、付加したE-I-S配列を含む最終的な挿入断片の鎖長が6の倍数になるように塩基数を設計する(いわゆる「6のルール(rule of six)」; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72:891-899, 1998; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67:4822-4830, 1993; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67: 4822-4830, 1993)。E-I-S配列は、例えば挿入断片のオリゴDNAの3'側にセンダイウイルスのマイナス鎖のS配列、I配列、およびE配列、例えばそれぞれ5'-CTTTCACCCT-3'(配列番号:

12)、5'-AAG-3'、および 5'-TTTTTCTTACTACGG-3' (配列番号:13) が用いられる。

[0047] PCRは、Taqポリメラーゼまたはその他のDNAポリメラーゼを用いる通常の方法を用いることができる。増幅した目的断片はNotIで消化した後、pBluescript等のプラスミドベクターのNotI部位に挿入する。得られたPCR産物の塩基配列をシーケンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択する。このプラスミドから挿入断片をNotIで切り出し、ゲノムcDNAを含むプラスミドのNotI部位にクローニングする。またプラスミドベクターを介さずにゲノムcDNAのNotI部位に直接挿入し、組み換えセンダイウイルスcDNAを得ることも可能である。

[0048] 例えば、組み換えセンダイウイルスゲノムcDNAであれば、文献記載の方法に準じて構築することができる (Yu, D. et al., Genes Cells 2: 457-466, 1997; Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997)。例えば、外来遺伝子のセンス鎖の3'側にE-I-S配列が連結した2本鎖DNAを合成する。これをゲノムのプラス鎖をコードするcDNAの所望のS配列のすぐ3'側に挿入する。例えばプラス鎖ゲノムをコードするcDNAにおいて、所望のウイルス蛋白質遺伝子のコード配列とこれを転写するS配列の間に予め制限酵素部位 (例えばNotI部位) を作っておき、ここに外来遺伝子 - E-I-S配列をコードするDNAを制限酵素部位を利用して挿入することができる (Tokusumi, T. et al. (2002) Virus Res 86(1-2), 33-8)。

[0049] このようにして作製したウイルスゲノムRNAをコードするDNAを、上記のウイルス蛋白質 (L、P、およびN) 存在下で細胞内で転写させることにより、ウイルスベクターを再構成することができる。組み換えウイルスの再構成は公知の方法を利用して行うことができる (WO97/16539; WO97/16538; WO03/025570; Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:

15400-15404)。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダイウイルスなどを含むマイナス鎖RNAウイルスをDNAから再構成させることができる。これらの方法に準じて、本発明のウイルスを再構成させることができる。ウイルスゲノムをコードするDNAにおいて、F遺伝子、HN遺伝子、および/またはM遺伝子を欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、細胞に導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることが可能である(Hirata, T. et al., 2002, J. Virol. Methods, 104:125-133; Inoue, M. et al., 2003, J. Virol. 77:6419-6429)。本発明は、抗腫瘍剤の製造における、免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターの使用に関する。また本発明は、抗腫瘍剤の製造における、免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスのウイルスのウィルスゲノムRNAまたはその相補RNAをコードするDNAの使用に関する。本発明の抗腫瘍剤は、腫瘍の予防および/または治療のための医薬として利用される。

[0050] 具体的な手順は、(a) マイナス鎖RNAウイルスゲノムRNA(マイナス鎖RNA)またはその相補鎖(プラス鎖)をコードするDNAを、N、P、およびL蛋白質を発現する細胞で転写させる工程、(b) 該細胞またはその培養上清から該ゲノムRNAを含む複合体を回収する工程、により製造することができる。転写のために、ゲノムRNAをコードするDNAは適当なプロモーターの下流に連結される。転写されたゲノムRNAは N、L、およびP蛋白質の存在下で複製され、これらの蛋白質を含むRNP複合体を形成する。そして M、HN、およびF蛋白質の存在下でエンベロープに包まれたウイルス粒子が形成される。ゲノムRNAをコードするDNAは、例えばT7プロモーターの下流に連結させ、T7 RNA ポリメラーゼによりRNAに転写させる。プロモーターとしては、T7ポリメラーゼの認識配列を含むもの以外にも所望のプロモーターを利用することができる。あるいは、インビトロで転写させたRNAを細胞にトランスフェクトしてもよい。

[0051] DNAからのゲノムRNAの最初の転写に必要なT7 RNAポリメラーゼ等の酵素は、これを発現するプラスミドまたはウイルスベクターの導入によって供給することができる

し、または、例えばこの遺伝子を細胞の染色体に、発現を誘導できるように組み込んでおき、ウイルス再構成時に発現を誘導することにより供給することもできる。またゲノムRNA、およびウイルス再構成に必要なウイルス蛋白質は、例えばこれらを発現するプラスミドの導入によって供給する。

- [0052] ゲノムRNAを発現するDNAを細胞内に導入するには、例えばリン酸カルシウム法(Graham, F. L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223)、種々のトランスフェクション試薬を用いた方法、あるいは電気穿孔法等を用いることができる。リン酸カルシウム法については、例えばChenおよびOkayama(Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745)に従って、2〜4% CO_2 、35℃、15〜24時間、沈殿混液中のDNA濃度 20〜30 micro-g/ml の条件で実施することができる。トランスフェクション試薬については、DEAE-デキストラン(Sigma #D-9885 M.W. 5×10^5)、DOTMA(Roche)、SuperfectTM(QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER(Roche #1811169)などを用いることができる。トランスフェクション試薬とDNAとの複合体がエンドソーム中で分解されてしまうのを防ぐため、クロロキンを加えることができる(Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。また、電気穿孔法は、細胞選択性がないという点で汎用性が高く、パルス電流の持続時間、パルスの形、電界(電極間のギャップ、電圧)の強さ、バッファの導電率、DNA濃度、細胞密度を最適化して適用される。ベクター再構成のためのDNAの細胞への導入には、操作が簡便で多量の細胞を用いて多数の検体を検討することができる点で、トランスフェクション試薬を用いる方法が適している。好適には SuperfectTM Transfection Reagent(QIAGEN, Cat No. 301305)、または DOSPER Liposomal Transfection Reagent(Roche, Cat No. 1811169)が用いられるが、これらに制限されない。

- [0053] cDNAからのウイルスの再構成は具体的には例えば以下のようにして行うことができる。

24穴から6穴程度のプラスチックプレートまたは100 mmペトリ皿等で、10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質(100 units/ml ペニシリンGおよび100 micro-g/ml ストレプトマイシン)を含む最少必須培地(MEM)を用いてサル腎臓由来細胞株LLC-MK2(

ATCC CCL-7)をほぼ100%コンフルエントになるまで培養し、例えば 1 micro-g/ml psoralen (ソラレン) 存在下、紫外線 (UV) 照射処理を20分処理で不活化した、T7 RNAポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスvTF7-3 (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986, Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996)を2 PFU/細胞で感染させる。ソラレンの添加量およびUV照射時間は適宜調整することができる。感染1時間後、2〜60 micro-g、より好ましくは3〜20 micro-gの組換えセンダイウイルスのゲノムRNAをコードするDNAを、ウイルスRNPの生成に必須なトランスに作用するウイルス蛋白質を発現するプラスミド (0.5〜24 micro-gのpGEM-N、0.25〜12 micro-gのpGEM-P、および0.5〜24 micro-gのpGEM-L) (Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996)と共にSuperfect (QIAGEN 社)を用いたリポフェクション法等によりトランスフェクションする。N、P、およびLをコードする発現ベクターの量比は例えば 2:1:2 とすることが好ましく、プラスミド量は、例えば1〜4 micro-gのpGEM-N、0.5〜2 micro-gのpGEM-P、および1〜4 micro-gのpGEM-L程度で適宜調整する。

- [0054] トランスフェクションを行った細胞は、所望により100 micro-g/mlのリファンピシン (Sigma) 及びシトシンアラビノシド (AraC)、より好ましくは40 micro-g/mlのシトシンアラビノシド (AraC) (Sigma)のみを含む血清不含のMEMで培養し、ワクシニアウイルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウイルスの回収率を最大にするように薬剤の最適濃度を設定する (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)。トランスフェクションから48〜72時間程度培養後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎した後、RNPを含む破碎物をLLC-MK2細胞に再度トランスフェクションして培養する。または、培養上清を回収し、LLC-MK2細胞の培養液に添加して感染させ培養する。トランスフェクションは、例えばリポフェクトアミンまたはポリカチオニックリポソームなどと共に複合体を形成させて細胞に導入することが可能である。具体的には、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Roche)、SuperfectTM (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Roche #1811169)などが挙げられる。エンドソーム中での分解を防ぐため、クロロキンを加えることもできる (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。RNPが導入された細胞では、RNPからのウイ

ルス遺伝子の発現およびRNPの複製の過程が進行しウイルスが増幅する。得られたウイルス溶液(培養上清)を希釈(例えば 10^6 倍)して再増幅を繰り返すことにより、ワクシニアウイルスvTF7-3は完全に除去することができる。再増幅は、例えば3回以上繰り返す。得られたベクターは -80°C で保存することができる。エンベロープ蛋白質をコードする遺伝子を欠損した伝播能を持たないウイルスを再構成させるには、エンベロープ蛋白質を発現するLLC-MK2細胞をトランスフェクションに使用するか、またはエンベロープ発現プラスミドを共にトランスフェクションすればよい。また、トランスフェクションを行った細胞にエンベロープ蛋白質を発現するLLC-MK2細胞を重ねて培養することによってエンベロープ遺伝子欠損型ウイルスを増幅することもできる(国際公開番号 WO00/70055 および WO00/70070参照)。

[0055] 回収されたウイルスの力価は、例えばCIU (Cell-Infected Unit) 測定または赤血球凝集活性(HA)の測定することにより決定することができる(WO00/70070; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999)。また、GFP(緑色蛍光蛋白質)などのマーカー遺伝子を搭載したベクターについては、マーカーを指標に直接的に感染細胞をカウントすることにより力価を定量することができる(例えばGFP-CIUとして)。このようにして測定した力価は、CIUと同等に扱うことができる(WO00/70070)。

[0056] ウイルスが再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞は特に制限されない。例えば、センダイウイルスベクター等の再構成においては、サル腎由来のLLC-MK2細胞およびCV-1細胞、ハムスター腎由来のBHK細胞などの培養細胞、ヒト由来細胞等を使うことができる。これらの細胞に適当なエンベロープ蛋白質を発現させることで、その蛋白質をエンベロープに含む感染性ウイルス粒子を得ることもできる。また、大量にセンダイウイルスベクターを得るために、上記の宿主から得られたウイルスベクターを発育鶏卵に感染させ、ベクターを増幅することができる。鶏卵を使ったウイルスベクターの製造方法は既に開発されている(中西ら編,(1993),「神経科学研究の先端技術プロトコールIII, 分子神経細胞生理学」, 厚生社, 大阪, pp.153-172)。具体的には、

例えば、受精卵を培養器に入れ9～12日間 37～38℃で培養し、胚を成長させる。ウイルスベクターを尿膜腔へ接種し、数日間(例えば3日間)卵を培養してウイルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、使用する組み換えセンダイウイルスにより変わり得る。その後、ウイルスを含んだ尿液を回収する。尿液からのセンダイウイルスベクターの分離・精製は常法に従って行うことができる(田代真人,「ウイルス実験プロトコル」, 永井、石浜監修, メジカルビュー社, pp.68-73,(1995))。

[0057] 例えば、F遺伝子を欠失したセンダイウイルスベクターの構築と調製は、以下のように行うことができる(WO00/70055 および WO00/70070参照)。

<1> F遺伝子欠失型センダイウイルスゲノムcDNAおよびF発現プラスミドの構築

センダイウイルス(SeV)全長ゲノムcDNA、pSeV18⁺ b(+)(Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820) (「pSeV18⁺ b(+)」は「pSeV18⁺」ともいう)のcDNAをSphI/KpnIで消化してフラグメント(14673bp)を回収し、pUC18にクローニングしてプラスミドpUC18/KSとする。F遺伝子欠損部位の構築はこのpUC18/KS上で行う。F遺伝子の欠損は、PCR-ライゲーション方法の組み合わせで行い、結果としてF遺伝子のORF(ATG-TGA=1698bp)を除いて例えばatgcatgccggcagatga(配列番号:14)で連結し、F遺伝子欠失型SeVゲノムcDNA(pSeV18⁺/ΔF)を構築する。PCRは、Fの上流には[forward: 5'-gttgagtactgcaagagc/配列番号:15, reverse: 5'-tttgccggcatgcatgtttccaaggggagagttttgcaacc/配列番号:16]、F遺伝子の下流には[forward: 5'-atgcatgccggcagatga/配列番号:17, reverse: 5'-tgggtgaatgagagaatcagc/配列番号:18]のプライマー対を用いたPCRの産物をEcoT22Iで連結する。このように得られたプラスミドをSacIとSalIで消化して、F遺伝子欠損部位を含む領域の断片(4931bp)を回収してpUC18にクローニングし、pUC18/dFSSとする。このpUC18/dFSSをDraIIIで消化して、断片を回収してpSeV18⁺のF遺伝子を含む領域のDraIII断片と置き換え、ライゲーションしてプラスミドpSeV18⁺/ΔFを得る。外来遺伝子は、例えばpUC18/dFSSのF遺伝子欠失部位にある制限酵素 NsiI および NgoMIV 部位に挿入する。このためには、例えば外来遺伝子断片を、NsiI-tailedプライマーおよびNgoMIV-tailedプライマーで増幅すればよい。

[0058] <2> SeV-F蛋白を誘導発現するヘルパー細胞の作製

センダイウイルスのF遺伝子(SeV-F)を発現するCre/loxP誘導型発現プラスミドの構築はSeV-F遺伝子をPCRで増幅し、Cre DNAリコンビナーゼにより遺伝子産物が誘導発現されるように設計されたプラスミドpCALNdlw(Arai, T. et al., J. Virology 72, 1998, p1115-1121)のユニークサイト SwaI部位に挿入し、プラスミドpCALNdLw/Fを構築する。

F遺伝子欠損ゲノムから感染ウイルス粒子を回収するため、SeV-F蛋白を発現するヘルパー細胞株を樹立する。細胞は、例えばSeVの増殖によく用いられているサル腎臓由来細胞株LLC-MK2細胞を用いることができる。LLC-MK2細胞は、10%の熱処理した不活化ウシ胎児血清(FBS)、ペニシリンGナトリウム 50単位/ml、およびストレプトマイシン 50 micro-g/mlを添加したMEMで37℃、5% CO₂で培養する。SeV-F遺伝子産物は細胞傷害性を有するため、Cre DNAリコンビナーゼによりF遺伝子産物を誘導発現されるように設計された上記プラスミドpCALNdLw/Fを、リン酸カルシウム法(mammalian transfection kit (Stratagene))により、周知のプロトコールに従ってLLC-MK2細胞に遺伝子導入を行う。

10cmプレートを用い、40%コンフルエントまで生育したLLC-MK2細胞に10 micro-gのプラスミドpCALNdLw/Fを導入後、10mlの10% FBSを含むMEM培地にて、37℃の5%CO₂ インキュベーター中で24時間培養する。24時間後に細胞をはがし、10ml培地に懸濁後、10cmシャーレ5枚を用い、5ml 1枚、2ml 2枚、0.2ml 2枚に蒔き、G418(GIBCO-BRL)を1200 micro-g/mlを含む10mlの10%FBSを含むMEM培地にて培養を行い、2日毎に培地交換しながら、14日間培養し、遺伝子の安定導入株の選択を行う。該培地により生育してきたG418に耐性を示す細胞はクローニングリングを用いて回収する。回収した各クローンは10cmプレートでコンフルエントになるまで拡大培養を続ける。

F蛋白質の発現誘導は、細胞を6cmシャーレにてコンフルエントまで生育させた後、アデノウイルスAxCANCreを斉藤らの方法(Saito et al., Nucl. Acids Res. 23: 3816-3821 (1995); Arai, T. et al., J. Virol 72, 1115-1121 (1998))により例えば moi=3で感染させて行うことができる。

[0059] <3> F遺伝子欠失SeVウイルスの再構築及び増幅

上記 pSeV18⁺/ΔF の外来遺伝子が挿入されたプラスミドを以下のようにして LLC-MK2細胞にトランスフェクションする。LLC-MK2 細胞を 5×10^6 cells/dish で 100mmのシャーレに播く。T7 RNAポリメラーゼによりゲノムRNAの転写を行わせる場合には、細胞培養24時間後、ソラレン(psoralen)と長波長紫外線(365nm)で 20 分間処理したT7 RNAポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス(PLWUV-VacT7:Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986))をMOI 2程度で室温で1時間感染させる。ワクシニアウイルスへの紫外線照射には、例えば15ワットバルブを5本が装備された UV Stratalinker 2400(カタログ番号 400676 (100V), ストラタジーン社, La Jolla, CA, USA)を用いることができる。細胞を無血清のMEMで洗浄した後、ゲノムRNAを発現するプラスミド、およびマイナス鎖RNAウイルスのそれぞれN、P、L、F、およびHN蛋白質を発現する発現プラスミドを、適当なリポフェクション試薬を用いてこの細胞にトランスフェクトする。プラスミドの量比は、これに限定されないが、好適には順に 6:2:1:2:2:2 とすることができる。例えば、ゲノムRNAを発現するプラスミド、並びにN、P、L、および FプラスHN蛋白質を発現する発現プラスミド(pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L及びpGEM/F-HN; WO00/70070, Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996))を、それぞれ12 micro-g, 4 micro-g, 2 micro-g, 4 micro-g及び4 micro-g/dishの量比トランスフェクトする。数時間培養後、血清を含まないMEMで細胞を2回洗浄し、40 micro-g/mLの Cytosine beta-D-arabinofuranoside (AraC:Sigma, St.Louis, MO)及び7.5 micro-g/mLのTrypsin(Gibco-BRL, Rockville, MD)を含むMEMで培養する。これらの細胞を回収し、ペレットをOptiMEM に懸濁する(10^7 cells/ml)。凍結融解を3回繰り返してlipofection reagent DOSPER (Roche #1811169)と混合し(10^6 cells/25 micro-l DOSPER)室温で15分放置した後、上記でクローニングしたF発現ヘルパー細胞にトランスフェクション(10^6 cells /well 12-well-plate)し、血清を含まないMEM(40 micro-g/ml AraC, 7.5 micro-g/ml トリプシンを含む)で培養し、上清を回収する。F以外の遺伝子、例えばHNまたはM遺伝子を欠損したウイルスも、これと同様の方法で調製することができる。

[0060] F遺伝子欠失またはHN遺伝子欠失は、SeVベクターを非伝播性にするために、また

、M遺伝子欠失は感染細胞からの粒子形成を不能にするために有効である。また、F、HN、およびMの少なくとも2つの遺伝子の任意の組み合わせを欠損するベクターは、より安全性が保障される。例えば、MおよびF遺伝子両欠失SeV (SeV/ $\Delta M \Delta F$) は、非伝播性でかつ粒子形成を欠くベクターとなる。SeV/ $\Delta M \Delta F$ はin vitroおよびin vivoで高レベルの感染性および遺伝子発現能を保っており、そのレベルは野生型SeVベクターのレベルと同様である。SeV/ $\Delta M \Delta F$ のこれらの特徴は、抗腫瘍処置におけるSeVの安全性の向上にさらに寄与するものと考えられる。

[0061] ウイルス遺伝子欠損型ベクターを調製する場合、例えば、ベクターに含まれるウイルスゲノム上で欠損しているウイルス遺伝子が異なる2種またはそれ以上のベクターを同じ細胞に導入すれば、それぞれで欠損するウイルス蛋白質が、他のベクターからの発現により供給されるため、互いに相補しあって感染力のあるウイルス粒子が形成され、複製サイクルがまわりウイルスベクターが増幅される。すなわち、2種またはそれ以上の本発明のウイルスベクターを、ウイルス蛋白質を相補する組み合わせで接種すれば、それぞれのウイルス遺伝子欠損型ウイルスベクターの混合物を大量かつ低コストで生産することができる。これらのウイルスは、ウイルス遺伝子が欠損しているため、ウイルス遺伝子を欠損していないウイルスに比べゲノムサイズが小さくなりサイズの大きい外来遺伝子を保持することができる。また、ウイルス遺伝子の欠損により増殖性がないこれらのウイルスは細胞外で希釈され共感染の維持が困難であることから、不稔化するため、環境放出管理上の利点がある。

[0062] 本明細書に記載したウイルス製造方法に従えば、本発明のウイルスベクターは、例えば 1×10^5 CIU/mL以上、好ましくは 1×10^6 CIU/mL以上、より好ましくは 5×10^6 CIU/mL以上、より好ましくは 1×10^7 CIU/mL以上、より好ましくは 5×10^7 CIU/mL以上、より好ましくは 1×10^8 CIU/mL以上、より好ましくは 5×10^8 CIU/mL以上の力価でウイルス産生細胞の細胞外液中に放出させることが可能である。ウイルスの力価は、本明細書および他に記載の方法により測定することができる (Kiyotani, K. et al., Virology 177(1), 65-74 (1990); WO00/70070)。

[0063] 回収したウイルスベクターは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法はフィルトレーション(濾過)、遠心分離、吸着、およびカラム精製等を含む公知の

精製・分離方法またはその任意の組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、ウイルスベクターを含む溶液中で該ウイルスの成分が主要な割合を占めることを言う。例えば実質的に純粋なウイルスベクター組成物は、溶液中に含まれる全蛋白質(但しキャリアーや安定剤として加えた蛋白質は除く)のうち、ウイルスベクターの成分として含まれる蛋白質の割合が10% (重量/重量) 以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。例えばパラミクソウィルスベクターであれば、具体的な精製方法としては、セルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法(特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報)、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法(WO97/32010)等を例示することができるが、これらに制限されない。

- [0064] 本発明のウイルスベクターを含む組成物の製造においては、ベクターは必要に応じて薬理学的に許容される所望の担体または媒体と組み合わせることができる。「薬学的に許容される担体または媒体」とは、ベクターと共に投与することが可能であり、ベクターによる遺伝子導入を有意に阻害しない材料である。このような担体または媒体としては、例えば滅菌水、塩化ナトリウム溶液、デキストロース溶液、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸含有リンゲル溶液、培養液、血清、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)などが挙げられ、これらとベクターを適宜組み合わせることで製剤化することが考えられる。また本発明の組成物は、脱イオン水、デキストロース水溶液等の担体または媒体を含んでもよい。また、リポソームの膜安定化剤(例えばコレステロール等のステロール類)を含んでもよい。また、抗酸化剤(例えばトコフェロールまたはビタミンEなど)を含んでもよい。さらに、その他にも、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。また保存剤やその他の添加剤を添加することができる。本発明の組成物は、水溶液、カプセル、懸濁液、シロップなどの形態であり得る。また本発明の組成物は溶液、凍結乾燥物、またはエアロゾルの形態の組成物であってよい。凍結乾燥物の場合は安定化剤としてソルビトール、シュクロース、アミノ酸及び各種蛋白質等を含んでもよい。本発明は、免疫刺激性サ

イトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターを含む抗腫瘍剤に関する。また本発明は、免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターが導入された細胞を含む抗腫瘍剤に関する。本発明のベクターを含む組成物、および本発明のベクターが導入された細胞は、抗腫瘍医薬として有用である。また本発明のベクター組成物および本発明のベクターが導入された細胞は、抗腫瘍ワクチンとして有用である。該ベクター組成物および細胞は、免疫原性を高めるために、サイトカイン、コレラ毒素、サルモネラ毒素等の免疫促進剤を添加することもできる。またワクチンには、ミョウバン、不完全Freund'sアジュバント、MF59 (オイルエマルジョン)、MTP-PE (マイコバクテリア細胞壁由来の muramyl tripeptide)、および QS-21 (soapbark tree *Quilaja saponaria* 由来)などのアジュバントを組み合わせることもできる。

[0065] また、組成物または細胞の投与に際しては、アジュバント効果を高めるサイトカイン類を組み合わせることも有効である。このような遺伝子としては、例えば i) 一本鎖 IL-12 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (15): 8591-8596, 1999)、ii) インターフェロン- γ (米国特許第 5,798,100号)、iii) 顆粒球コロニー刺激因子 (GM-CSF)、iv) GM-CSF と IL-4 の組み合わせ (J. Neurosurgery 90 (6), 1115-1124 (1999)) などが挙げられる。

[0066] マイナス鎖RNAウイルスベクターのインビボでの投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与組成物の形態、投与方法、導入サイトカイン遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。投与経路は適宜選択することができるが、例えば注射器またはカテーテル等により腫瘍に注入される。投与されるベクターは好ましくは約 10^5 CIU/ml から約 10^{11} CIU/ml、より好ましくは約 10^7 CIU/ml から約 10^9 CIU/ml、最も好ましくは約 1×10^8 CIU/ml から約 5×10^8 CIU/ml の範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。ヒトにおいては1回当たりの投与量は 2×10^5 CIU - 2×10^{11} CIU が好ましく、投与回数は、1回または臨床上容認可能な副作用の範囲で複数回可能であり、1日の投与回数についても同様である。ヒト以外の動物についても、例えば目的の動物とヒトとの体重比または投与標的部位の容積比 (例えば平均値) で上記の投与量を換算した量を投与することが

できる。なお、伝播性のマイナス鎖RNAウイルスベクターを個体または細胞に投与後、治療が完了するなどウイルスベクターの増殖を抑止する必要がある際には、RNA依存性RNAポリメラーゼ阻害剤を投与すれば、宿主に障害を与えずにウイルスベクターの増殖だけを特異的に抑止することもできる。エキスピボ投与の場合は、体外(例えば試験管またはシャーレ内)で標的細胞にベクターを接触させる。MOIは1〜500の間で投与することが好ましく、より好ましくは2〜300、さらに好ましくは3〜200、さらに好ましくは5〜100、さらに好ましくは7〜70である。

- [0067] 免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターまたは該ベクターが導入された細胞の腫瘍部位への投与は、腫瘍抗原または該抗原を発現するベクターによる免疫と組み合わせられることが好ましい。実施例で示すように、本発明のベクターのin vivo投与を、腫瘍抗原の免疫と組み合わせた治療は、ベクターの単独投与に比べ有意に高い抗腫瘍作用を発揮する。腫瘍抗原またはそれを発現するベクターの接種は、免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターの投与と同時、あるいは前後に行えばよい。免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターの投与と腫瘍抗原またはそれを発現するベクターの接種との間隔は、例えば7日以内、好ましくは6日以内、5日以内、4日以内、3日以内、または2日以内、より好ましくは24時間以内である。腫瘍抗原の免疫で用いられる抗原としては、例えば増殖能を失わせた腫瘍細胞、または腫瘍細胞溶解物などが挙げられる。腫瘍細胞は、加熱処理、放射線処理、あるいはマイトマイシンC処理などで処理し増殖性をなくすことが好ましい。例えば、X線照射を利用する場合、総放射線量700〜3300 Radで照射することができる。マイトマイシンC処理法は、例えば、細胞に25〜50 micro-g/mlのマイトマイシン Cを添加し、37℃、30〜60分間保温処理することができる。熱による細胞処理方法は、例えば、50〜65℃で20分間加熱処理を行うことができる。また、腫瘍細胞を用いる代わりに、標的とする腫瘍細胞で発現する腫瘍抗原を用いてもよい。腫瘍抗原は、天然または組み換えポリペプチドであってよい。または、腫瘍抗原を発現するベクターを投与してもよい。腫瘍抗原を発現するベクターとしては、特に制限はなく、例えばプラスミド、ウイルスベクター、naked DNAなど、投与個体において腫瘍抗原を発現する能力を持つ所望の発現ベクターが用いられる、こ

のようなベクターは、適当なプロモーター（例えばSV40プロモーター、CAGプロモーター、CMVプロモーター、EF1プロモーター、LTRプロモーター）の下流に腫瘍抗原をコードする核酸が連結された核酸を含むものであってよい。あるいは、ウイルスベクターを用いる場合は、各ウイルスベクターに適した発現調節配列の制御下に腫瘍抗原をコードする核酸が連結される。ベクターの投与は、in vivoまたはex vivoで行ってよい。腫瘍抗原は治療対象癌により適宜選択されるが、腫瘍抗原の例としては、卵巣癌等に関連するMuc-1 または Muc-1様ムチンタンデムリピートペプチド（米国特許第5,744,144号）、子宮頸癌を引き起こすヒト乳頭腫ウイルス蛋白質E6およびE7、メラノーマ抗原MART-1、MAGE-1、-2、-3、gp100およびチロシナーゼ、前立腺癌抗原PSA、その他にも、CEA（Kim, C. et al., Cancer Immunol. Immunother. 47 (1998) 90-96）、およびHer2neu（HER2p63-71、p780-788; Eur. J. Immunol. 2000; 30: 3338-3346）などが挙げられる。腫瘍抗原の接種部位は適宜選択されるが、例えば経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、腹腔内、静脈内、または皮下等に行われうる。好ましくは皮下に接種される。腫瘍細胞またはその溶解物を接種する場合は、接種量は一般的には 10^5 – 10^9 細胞、好ましくは 10^6 – 10^8 細胞、より好ましくは約 10^7 細胞とすることができる。本発明は、免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクター、および腫瘍抗原または該抗原を発現するベクター、を含む抗腫瘍処置のためのキットにも関する。該キットは、免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクター、および腫瘍抗原または該抗原を発現するベクターがまとまったパッケージである。該パッケージは、例えば該マイナス鎖RNAウイルスベクターを含む容器と、腫瘍抗原または該抗原を発現するベクターを含む容器とを含む。このようなパッケージは、本明細書に記載した組み合わせ処置のために使用される。

- [0068] 本発明の抗腫瘍処置方法は所望の固形腫瘍に適用できるが、特に中枢神経系組織（脳実質内または実質外を含む）の腫瘍の処置に適しており、例えば神経膠腫、転移性脳腫瘍、髄芽腫、胚細胞腫、髄膜腫、下垂体腺腫、および神経鞘腫などの脳腫瘍への適用に適している。特に好ましくは神経膠腫（グリオーマ）の処置に適用される。免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターは、脳腫瘍に対して高い効率でサイトカイン遺伝子を導入する能力を持ち、末梢で活性化された

免疫担当細胞の脳腫瘍組織への有意な移動を誘導する。また、腫瘍抗原の免疫接種と組み合わせることにより、脳腫瘍増殖を抑制することができる。中枢神経系へのベクターの導入に関しては、以下の文献も参照のこと (Bitzer, M. et al. J. Gene Med. 5:543-553, 2003; Li, H.O. et al., J. Virol. 74: 6564-6569, 2000; Inoue, M. et al., Mol. Ther. 5:S174, 2002; Shirakura, M. et al., Exp. Animal 52: 119-127, 2003; Suzuki, S. et al., Eur. J. Neurosci. 13: 2299-2308, 2001)。

- [0069] 本発明の抗腫瘍処置の対象生物としては特に制限はなく、ヒトおよび非ヒト哺乳動物を含む所望の哺乳動物が含まれ、具体的には、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ブタ、ネコ、ウシ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、サルが挙げられる。

実施例

- [0070] 以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、すべて本明細書の一部として組み込まれる。

- [0071] [細胞および動物]

ラット9L神経膠肉腫 (gliosarcoma) 細胞は、10% FCSを含むDulbecco's modified Eagle medium中、5% CO₂を含む湿大気中で維持した。体重200および240 g (7-8週齢) の雄Fisher 344ラットを、以下に記載したように実験に用いた。これらの動物は Laboratory Animal Resources Commission Standards (実験動物資源委員会基準) に従い、specific pathogen-free (SPC; 特定病原体フリー) の環境下で維持した。

- [0072] [脳腫瘍モデルおよび治療]

動物を麻酔し定位固定装置に固定した。穿頭孔 (burr hole) を適切な位置に開けた (ブレグマ後方 4 mm、正中線より右 3 mm)。硬膜から腹側 (ventral) 3 mmの位置に25ゲージ針を挿入し、マイクロインジェクター (Harvard Apparatus, South Natick, MA) を用い、10 micro-lの培地中に含まれる10⁵ のシンジェニックな9L腫瘍細胞を5分かけてゆっくりと注入した (day 0)。治療工程は9L腫瘍細胞の脳内 (i.c.) 接種の3日後 (day 3) に開始した。動物にはSeV18⁺hIL2/ΔMΔF または SeV18⁺lacZ/ΔMΔFの脳内移入 (i.c. transplantation)、および/または照射した野生型9L腫瘍細胞の皮下免疫 (s.c. immunization) を行った。脳内移入では、10 micro-l PBS中の1x10⁷ CIU

の各SeVを上記と同様の定位固定座標にて移入した。皮下免疫では、野生型9L細胞を30 Gyで照射し、 1×10^6 の照射9L細胞を含む100 micro-lの培地を下腹部 (lower abdominal quadrant) に接種した (Iwadate, Y. et al., Cancer Res., 61: 8769-8774, 2001)。

[0073] [MRIおよび生存検査]

腫瘍細胞を接種した全ての動物は7日毎にMRI検査を行い、i.c.腫瘍の体積を評価した。50 mg/kgのペントバルビタールで麻酔したラットに0.2 mlのGd-DTPA (0.8-1.0 ml/kg) を注入し、1.5テスラのMR装置 (Sigma Advantage, General Electric, Milwaukee, WI) を用いて冠状断面のT1強調画像 (TR 500 msec, TE 11 msec, 3 mm 厚, gapless) を得た。腫瘍の体積 (mm^3) は、各MR画像領域 (mm^2) に画像厚をかけたもののGd-DTPA強調部位の和として算出した。MRIで見積もった腫瘍体積は、画像解析の直後に得た実際の腫瘍重量とリニアな相関がある (Namba, H. et al., Human Gene Ther., 7: 1847-1852, 1996)。各群の腫瘍体積の解析を、単変量分散分析 (一元配置分散分析 (One-factor ANOVA)) により実施した。

ラットは、重度の麻痺 (paresis)、運動失調 (ataxia)、periophtalmic encrustations (眼周囲外皮形成)、または20 %を超える体重減少が起こるまで毎日観察した。このような動物の平均余命は1日未満であるから、犠牲死させた日を死亡日として扱った。生存解析はKaplan-Meier法によるlog-rank testにより行なった。

[0074] [免疫組織化学]

腫瘍担持ラットの上行大動脈に4% パラホルムアルデヒドを還流させ、脳を取り出した。脳標本の15 micro-m厚の凍結切片を抗CD4細胞 (W3/25, Serotec, Oxford, UK)、抗CD8細胞 (OX-8, Serotec)、抗NK細胞 (1.2.3, Serotec)、および抗ヒトIL-2 (DAKO, Tokyo, Japan) モノクローナル抗体と反応させ、その後西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG (MBL, Nagoya, Japan) と反応後、3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, St. Louis, MI) で染色した。X-Galの組織染色によりbeta-ガラクトシダーゼの発現を検出した。

[0075] [実施例1] ヒトIL-2遺伝子を搭載する組み換えマイナス鎖RNAウイルスベクターの構築

センドライウイルス (SeV) 全長ゲノムのゲノム順序は、3'端にあるリーダー (ld) に続き、ウイルス遺伝子ヌクレオキャプシド (NP), ホスホ (P), マトリックス (M), フュージョン (F), ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ (HN), および ラージ (L)、そして最後の5'端に短いテラー (tr) が続く (図1)。M遺伝子およびF遺伝子の両方を欠失させたSeVベクター (SeV/ Δ M Δ F) を実験に用いた。F蛋白質はウイルス感染に必須でありM蛋白質はウイルスのアセンブリおよびバディン (budding) に機能するため、SeV/ Δ M Δ F は非伝播性で感染細胞からの粒子形成が起こらない。ヒトIL-2遺伝子を搭載する SeV/ Δ M Δ Fベクター (hIL-2-SeV/ Δ M Δ F) および lacZ遺伝子を搭載するSeV/ Δ M Δ Fベクター (lacZ-SeV/ Δ M Δ F) を、以前の記載の通りに構築した (Inoue, M. et al., J. Virol., 77: 6419-6429, 2003; Inoue, M. et al., Mol. Ther., 5: S174, 2002)。具体的には、SeV特異的転写調節シグナル配列を含むNotIタグ付きプライマー対 5'-ACTTGCGGCCGCGT TTAACGCGCGCCATGTACAGGATGCAACTCCTG TC-3' (配列番号:19) および 5'-ATCCGCGGCCGCGATGA ACTTTT CACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGATTT AAATG GCGCGCCA-3' (配列番号:20) を用いて、ヒトIL-2 (Accession number: A14844) cDNAを増幅した。増幅断片を元のpSeV18⁺/ Δ M Δ FのNotI部位に導入した。このようにして、hIL-2-SeV/ Δ M Δ FのcDNA (phIL2-SeV/ Δ M Δ F) を構築した。lacZ-SeV/ Δ M Δ FのcDNA (placZ-SeV/ Δ M Δ F) は、lacZ増幅断片を用いて同様に構築した (Li, H.O. et al., J. Virol., 74: 6564-6569, 2000)。T7 RNAポリメラーゼを発現するワクシニアウイルス vTF7-3 (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 8122-8126, 1986) をLLC-MK2細胞に感染させた後、phIL2-SeV/ Δ M Δ F および placZ-SeV/ Δ M Δ Fを細胞にトランスフェクトした。T7 RNAポリメラーゼにより転写が駆動されたhIL2-SeV/ Δ M Δ FとlacZ-SeV/ Δ M Δ FのRNAゲノムは、コトランスフェクトされた各プラスミドから発現が駆動されたN、P、およびL蛋白質によりエンキャプシユレートさせた (Ikeda, Y. et al., Exp. Eye Res., 75: 39-48, 2002)。回収されたSeVベクターをMおよびF両蛋白質を発現するパッケージング細胞株を用いて増幅した (Inoue, M. et al., J. Virol., 77: 6419-6429, 2003; Inoue, M. et al., Mol. Ther., 5: S174, 2002)。ウイルスの力価を感染性を基に決定し、cell infectious unit (CIU; 細胞

感染単位)として表記した。SeVベクターは使用するまで -80°C で保存した。

[0076] [実施例2] SeVベクターによるbeta-ガラクトシダーゼ遺伝子の脳内導入

SeVベクターによるbeta-ガラクトシダーゼ遺伝子の脳内導入の効率を、lacZ-SeV/ $\Delta M \Delta F$ (SeV/LacZとも略記) 注入の4、7、および14日後に取り出した正常脳組織または脳腫瘍において調べた。脳腫瘍組織に注入した場合、ベクターを注入した組織の外観は典型的には、lacZ-SeV/ $\Delta M \Delta F$ が注入された導入腫瘍細胞とそれらの細胞の子孫からなるX-gal陽性細胞のコロニーが散在していた(図2)。散在するX-gal染色コロニーの間に非導入腫瘍細胞が見られた。beta-ガラクトシダーゼの発現または蓄積はベクターの注入の7日後に最大となり、発現レベルは14日目まで持続した(図2)。腫瘍の周囲の正常脳への導入については、脈絡叢を除き、腫瘍周囲の組織ではほとんど見られなかった。正常脳組織に注入した場合には、腫瘍内注入の場合と同様の効率で神経およびグリア細胞への導入が観察された。ベクターの実質内注入によっては、上皮細胞には導入されなかった。

[0077] [実施例3] hIL2-SeV/ $\Delta M \Delta F$ ベクターのi.c.注入による抗腫瘍効果

9L神経膠肉腫を脳内に接種したナイーブラットでは増殖性(progressive)の腫瘍が発生し、接種から25日後(day 25)までにすべてのラットが死亡した。照射した全腫瘍細胞ワクチンを用いた皮下(s.c.)免疫を組み合わせたhIL2-SeV/ $\Delta M \Delta F$ (SeV/IL-2と略記)のi.c.投与の治療効果を、連続Gd強調MRIによる腫瘍体積計測により調べた(図3)。9L腫瘍細胞の接種から3週間目(day 21)にhIL2-SeV/ $\Delta M \Delta F$ のi.c.投与およびs.c.免疫治療を行ったラットの腫瘍体積($86.5 \pm 63.8 \text{ mm}^3$, $n=10$, on day 21)は、未処理($286 \pm 51.2 \text{ mm}^3$, $n=10$, on day 21)、s.c.免疫のみ($197 \pm 48.9 \text{ mm}^3$, $n=10$, on day 21)、lacZ-SeV/ $\Delta M \Delta F$ のi.c.投与とs.c.免疫の組み合わせ($233 \pm 73.2 \text{ mm}^3$, $n=6$, on day 21)、またはhIL2-SeV/ $\Delta M \Delta F$ のi.c.投与のみ($256 \pm 53.2 \text{ mm}^3$, $n=6$, on day 21)のものに比べ、有意に縮小していることが判明した(図4)。hIL2-SeV/ $\Delta M \Delta F$ を利用した組み合わせ治療(combinatory treatment)により、定着脳腫瘍はday 21には10匹中3匹のラットで完全に消滅した(図3)。対照的に、hIL2-SeV/ $\Delta M \Delta F$ のi.c.投与単独またはs.c.免疫単独における腫瘍の平均体積は未処理のものより縮小したが、それらの治療効果は、組み合わせ治療に比べると低く、

定着腫瘍の完全な消滅は観察されなかった(図4)。また図5に示すように、腫瘍担持ラットの寿命は、hIL2-SeV/ Δ M Δ Fのi.c.投与単独またはs.c.免疫単独の処置により未処理に比べ延長されたが、hIL2-SeV/ Δ M Δ Fベクターのi.c.投与をs.c.免疫と組み合わせた治療を行ったラットの寿命は、未処理のコントロールまたはその他の処置を行ったラットのそれに比べても有意に延長された($p < 0.05$, Logrank test)(図5)。

hIL2-SeV/ Δ M Δ Fを定着腫瘍の反対側の半球に注入した場合は、腫瘍増殖は影響を受けなかった(非提示データ)。この結果は、著しい治療効果を達成するには、IL-2の発現は標的腫瘍の近傍である必要があることを示唆している。

[0078] [実施例4] 免疫組織化学解析

脳腫瘍におけるIL-2蛋白質の発現を免疫組織化学的に調べた。IL-2蛋白質は、hIL2-SeV/ Δ M Δ Fベクターを注入した腫瘍内で拡散して発現していることが確認された(図6)。さらに、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、およびNK細胞の存在を調べた。hIL2-SeV/ Δ M Δ Fベクターのi.c.投与およびs.c.免疫で治療した腫瘍では、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、およびNK細胞の顕著な浸潤が観察された(図7)。これらの細胞のマイグレーションは、lacZ-SeV/ Δ M Δ Fベクターのi.c.注入およびs.c.免疫による治療、またはhIL2-SeV/ Δ M Δ Fベクターのi.c.投与単独による治療を行った腫瘍でも中程度に検出されたが、組み合わせ治療を行った場合は単独治療よりも顕著であった。

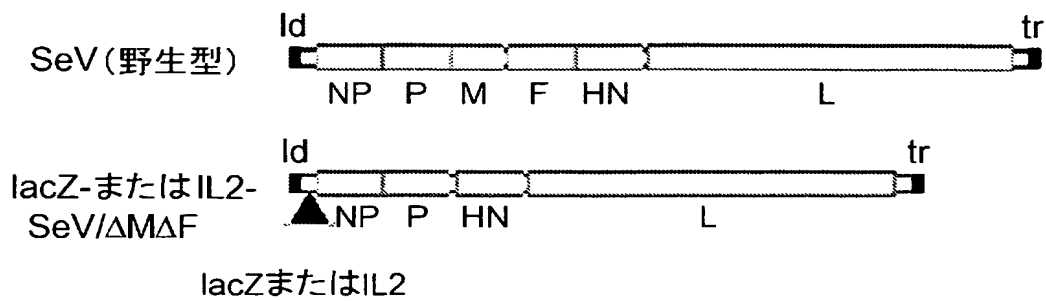
産業上の利用可能性

[0079] 本発明により、腫瘍に対する新たな治療方法が提供された。本発明の方法は、簡単な手法で効果的に腫瘍増殖を抑制できることから、癌治療へ広く適用されることが期待される。

請求の範囲

- [1] 免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターまたは該ベクターが導入された細胞を腫瘍部位に投与する工程を含む、抗腫瘍処置方法。
- [2] 腫瘍抗原または該抗原を発現するベクターで免疫する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。
- [3] 該腫瘍抗原または該抗原を発現するベクターを皮下接種により免疫する、請求項2に記載の方法。
- [4] 該腫瘍抗原が増殖能を失わせた腫瘍細胞または腫瘍細胞溶解物である、請求項2に記載の方法。
- [5] 腫瘍が脳腫瘍である、請求項1に記載の方法。
- [6] 免疫刺激性サイトカインがインターロイキン-2である、請求項1に記載の方法。
- [7] 免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターまたは該ベクターが導入された細胞を有効成分として含む抗腫瘍組成物。
- [8] 免疫刺激性サイトカインがインターロイキン-2である、請求項7に記載の組成物。
- [9] (a)免疫刺激性サイトカインをコードするマイナス鎖RNAウイルスベクター、および、
(b)腫瘍抗原または該抗原を発現するベクター、を含む抗腫瘍処置のためのキット。
- [10] 免疫刺激性サイトカインがインターロイキン-2である、請求項9に記載のキット。

[図1]



[図2]

正常脳組織

脳腫瘍

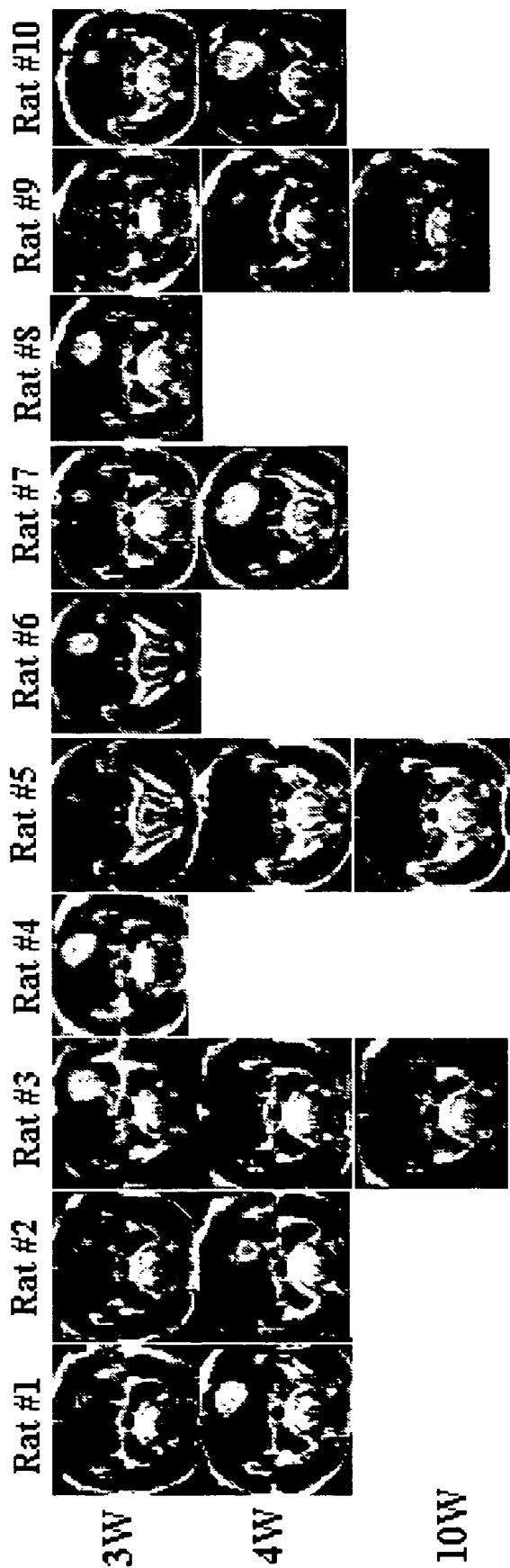
Day 4

Day 7

Day 14

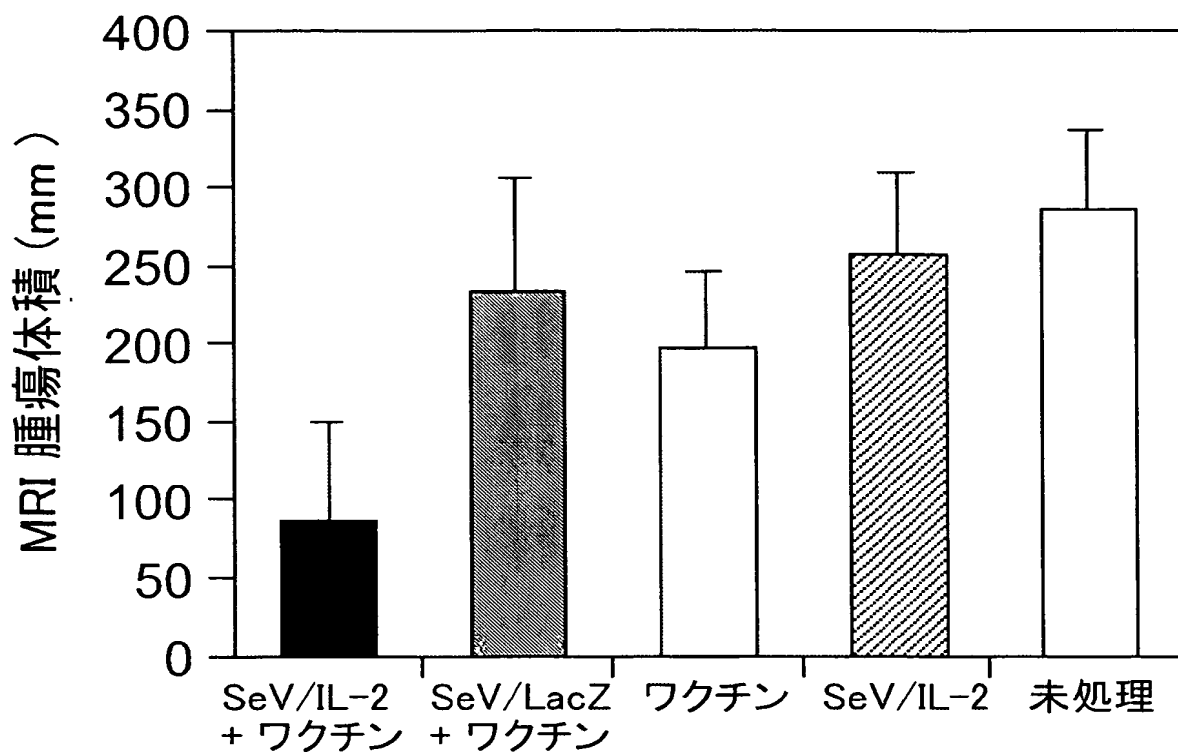
THIS PAGE BLANK (USPTO)

[図3]

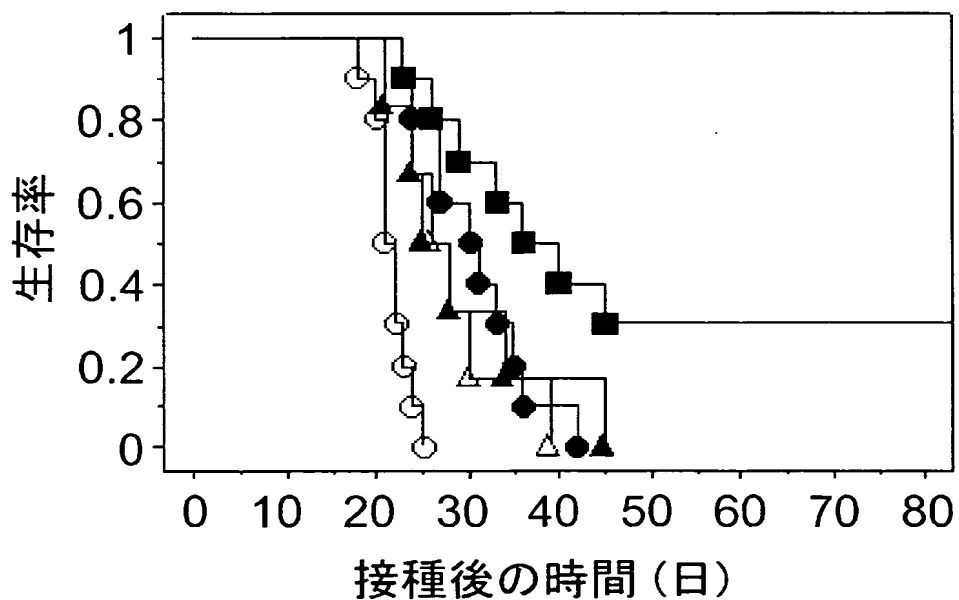


THIS PAGE BLANK (USPTO)

[図4]

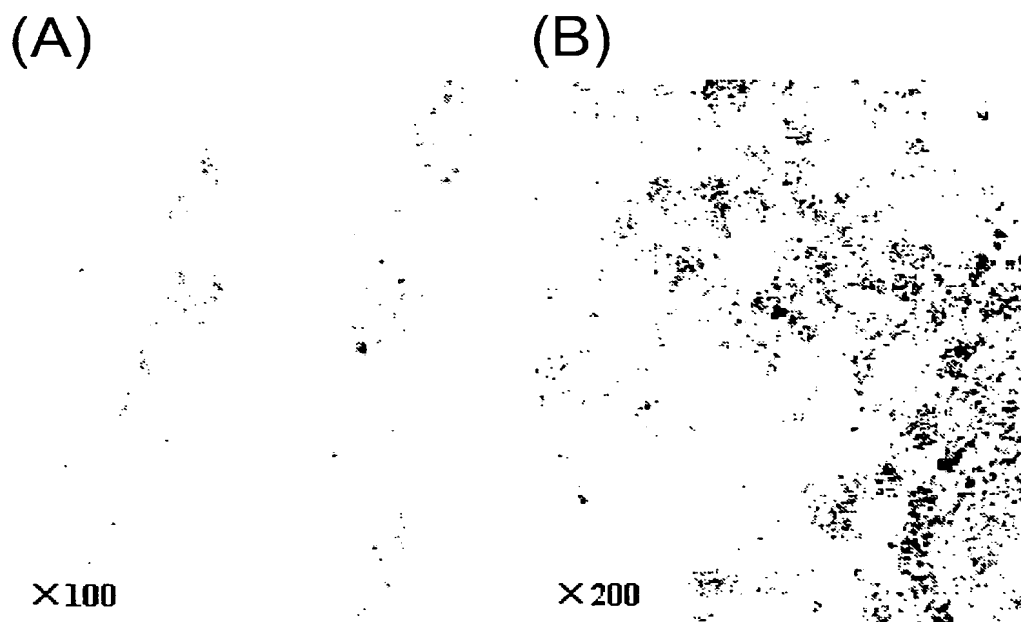


[図5]

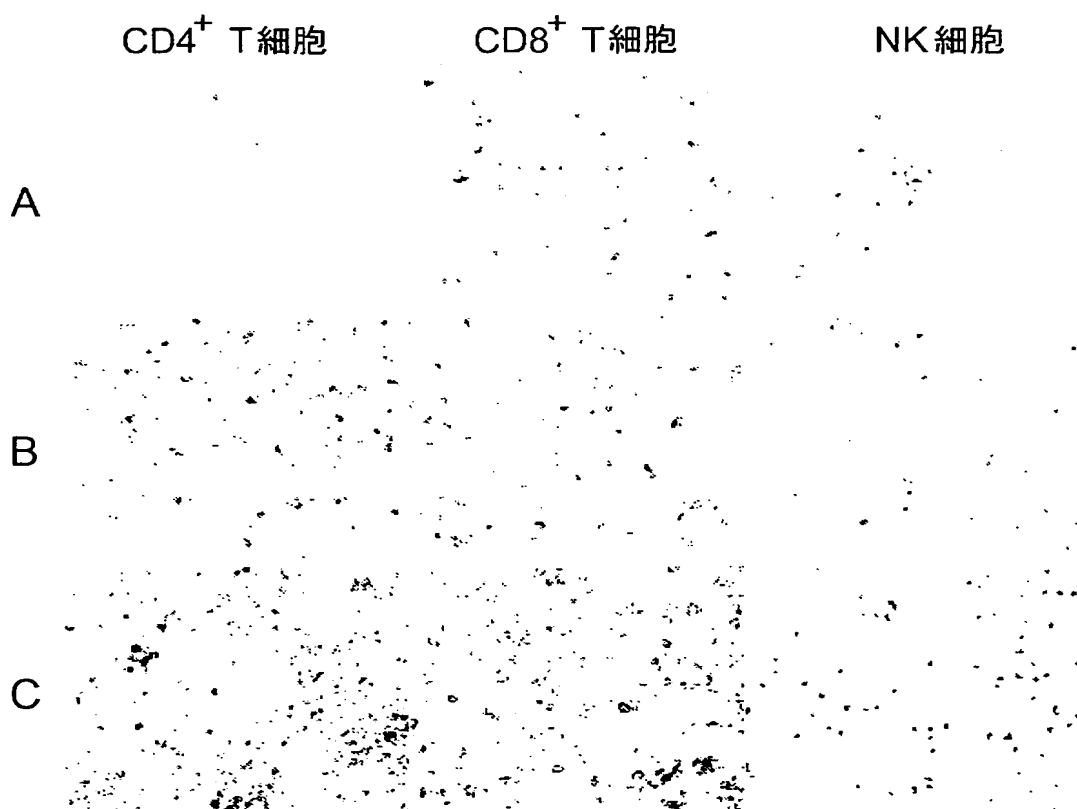


THIS PAGE BLANK (USPTO)

[図6]



[図7]



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K48/00, 35/12, 35/76, 38/00, 39/00, A61P35/00//C12N5/10, 15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K48/00, 35/12, 35/76, 38/00, 39/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), JSTPLUS (JOIS), JMEDPLUS (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 07-503455 A (SAN DIEGO REGIONAL CANCER CENTER), 13 April, 1995 (13.04.95), Full text; particularly, Claims; examples & WO 93/07906 A1 & EP 668781 A1 & US 5681562 A	7-10
Y	JP 58-157723 A (Ajinomoto Co., Inc.), 19 September, 1983 (19.09.83), Full text; particularly, Claims; examples & EP 89062 A1 & US 4789658 A	7-10
Y	BITZER M. et al., Negative-strand RNA viral vectors: intravenous application of Sendai virus vectors for the systemic delivery of therapeutic genes, Mol.Ther., 2003, Vol.7, No.2, p.210-7	7-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 April, 2005 (11.04.05)

Date of mailing of the international search report
26 April, 2005 (26.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000238

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Mamoru HASEGAWA, "Shinki Idenshi Chiryoyo Vector no Kaihatsu", The cell, 2001, Vol.33, No.6, pages 227 to 231	7-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000238

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1 - 6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1 to 6 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1 (iv), to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K48/00, 35/12, 35/76, 38/00, 39/00, A61P35/00 // C12N5/10, 15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K48/00, 35/12, 35/76, 38/00, 39/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), JSTPLUS (JOIS), JMEDPLUS (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 07-503455 A (サン ディエゴ リージョナル キャンサー センター) 1995.04.13 全文、特に特許請求の範囲及び実施例参照 & WO 93/07906 A1 & EP 668781 A1 & US 5681562 A	7-10
Y	JP 58-157723 A (味の素株式会社) 1983 09.19 全文、特に特許請求の範囲及び実施例参照 & EP 89062 A1 & US 4789658 A	7-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.04.2005

国際調査報告の発送日

26.04.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳子

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

4P

9638

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	BITZER M., et al., Negative-strand RNA viral vectors: intravenous application of Sendai virus vectors for the systemic delivery of therapeutic genes, Mol Ther, 2003, Vol.7, No.2, p. 210-7	7-10
Y	長谷川護, 新規遺伝子治療用ベクターの開発, 細胞, 2001, Vol. 33, No. 6, p. 227-231	7-10

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲1-6は手術又は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)